



PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

<p>(51) 国際特許分類6 C12N 15/54, 9/12, A61K 31/70, 38/46</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO00/24908</p> <p>(43) 国際公開日 2000年5月4日 (04.05.00)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP99/05916</p> <p>(22) 国際出願日 1999年10月26日 (26.10.99)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平10/304085 1998年10月26日 (26.10.98) JP</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 科学技術振興事業団 (JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY CORPORATION)[JP/JP] 〒332-0012 埼玉県川口市本町4丁目1番8号 Saitama, (JP)</p> <p>(72) 発明者 ; および (75) 発明者, / 出願人 (米国についてののみ) 審良 静男 (AKIRA, Shizuo)[JP/JP] 〒562-0031 大阪府箕面市小野原東6-17-18-202 Osaka, (JP) 嶋田 高広 (SHIMADA, Takahiro)[JP/JP] 〒592-0013 大阪府高石市取石5丁目4-18 Osaka, (JP)</p> <p>(74) 代理人 弁理士 佐伯憲生 (SAEKI, Norio) 〒103-0027 東京都中央区日本橋三丁目15番2号 高愛ビル9階 Tokyo, (JP)</p>		<p>(81) 指定国 CA, JP, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE)</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>
<p>(54) Title: IDENTIFICATION OF NOVEL SUBSTRATE I-TRAF OF IKK-i KINASE</p> <p>(54) 発明の名称 IKK-iキナーゼの新たな基質I-TRAFの同定</p> <p>(57) Abstract Novel Ikb kinase IKK-i which is a novel serine/threonine kinase capable of activating a transcription factor NF-kB which inhibits the expression of various genes relating to immune response; a gene encoding the same; and medicinal compositions containing the same.</p>		

(57)要約

本発明は、免疫応答に関わる種々の遺伝子の発現を制御する転写因子NF- κ Bを活性化することができる新規のセリン/スレオニンキナーゼである新規I κ BキナーゼIKK-i、それをコードする遺伝子及びそれを含有してなる医薬組成物を提供する。

本発明は免疫応答に関わる種々の遺伝子の発現を制御する転写因子NF- κ Bを活性化することができる新規のセリン/スレオニンキナーゼである新規I κ BキナーゼIKK-i、その遺伝子及び医薬組成物に関する。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE	アラブ首長国連邦	DM	ドミニカ	KZ	カザフスタン	RU	ロシア
AL	アルバニア	EE	エストニア	LC	セントルシア	SD	スーダン
AM	アルメニア	ES	スペイン	LI	リヒテンシュタイン	SE	スウェーデン
AT	オーストリア	FI	フィンランド	LK	スリ・ランカ	SG	シンガポール
AU	オーストラリア	FR	フランス	LR	リベリア	SI	スロヴェニア
AZ	アゼルバイジャン	GA	ガボン	LS	レソト	SK	スロヴァキア
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GB	英国	LT	リトアニア	SL	シエラ・レオネ
BB	バルバドス	GD	グレナダ	LU	ルクセンブルグ	SN	セネガル
BE	ベルギー	GE	グルジア	LV	ラトヴィア	SZ	スワジランド
BF	ブルキナ・ファソ	GH	ガーナ	MA	モロッコ	TD	チャード
BG	ブルガリア	GM	ガンビア	MC	モナコ	TG	トーゴ
BJ	ベナン	GN	ギニア	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BR	ブラジル	GW	ギニア・ビサウ	MG	マダガスカル	TZ	タンザニア
BY	ベラルーシ	GR	ギリシャ	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア	TM	トルクメニスタン
CA	カナダ	HR	クロアチア		共和国	TR	トルコ
CF	中央アフリカ	HU	ハンガリー	ML	マリ	TT	トリニダード・トバゴ
CG	コンゴ	ID	インドネシア	MN	モンゴル	UA	ウクライナ
CH	スイス	IE	アイルランド	MR	モーリタニア	UG	ウガンダ
CI	コートジボアール	IL	イスラエル	MW	マラウイ	US	米国
CM	カメルーン	IN	インド	MX	メキシコ	UZ	ウズベキスタン
CN	中国	IS	アイスランド	NE	ニジェール	VN	ヴェトナム
CR	コスタ・リカ	IT	イタリア	NL	オランダ	YU	ユーゴスラビア
CU	キューバ	JP	日本	NO	ノルウェー	ZA	南アフリカ共和国
CY	キプロス	KE	ケニア	NZ	ニュージーランド	ZW	ジンバブエ
CZ	チェコ	KG	キルギスタン	PL	ポーランド		
DE	ドイツ	KP	北朝鮮	PT	ポルトガル		
DK	デンマーク	KR	韓国	RO	ルーマニア		

明 細 書

I K K - i キナーゼの新たな基質 I - T R A F の同定

技術分野

本発明は、新規な I κ B キナーゼ、その遺伝子及び医薬組成物に関する。より詳細には、本発明は免疫応答に関わる種々の遺伝子の発現を制御する転写因子 N F - κ B を活性化することができ、かつ I - T R A F に結合しリン酸化する新規のセリン／スレオニンキナーゼである新規 I κ B キナーゼ I K K - i に関する。

背景技術

マクロファージは生体防御において重要な役割を果たしており細菌感染や悪性腫瘍の浸潤に対し、貪食、抗原提示、などの機能を果たすことが知られている。またマクロファージはリポポリサッカライド (L P S) や炎症性サイトカインによって活性化され、主要組織適合抗原、T N F - α (tumor necrosis factor - α)、I L - 1 β (interleukin - 1 β)、I L - 6 (interleukin - 6)、M I P - 1 α / β (macrophage inflammatory protein - 1 α / β) などの免疫応答に関わる種々の遺伝子を発現することが知られている。

N F - κ B は免疫応答に関わる種々の遺伝子の発現を制御する転写因子である。L P S、T N F - α 、I L - 1 β などによって活性化され、T N F - α 、I L - 1 β 、I κ B - α など免疫応答に重要な遺伝子の転写が N F - κ B の支配を受けていることが知られている。

本発明者らは、免疫応答に関わる新規遺伝子を同定するため、マクロファージ系腫瘍株である R A W 2 6 4 . 7 の L P S 刺激 (+) 群と (-) 群との間でサブトラクションを施行した。得られた遺伝子のうちクローン # 2 F 9 は、最近同定され N F - κ B を活性化することが知られている I κ B キナーゼ - α , β (I κ B kinase - α , β) (DiDonato JA, et al., Nature 1997 Aug 7;388(6642):548-554 ; Zandi E, et al., Cell 1997 Oct 17;91(2):243-252 ; Mercurio

F, et al., Science 1997 Oct 31;278(5339):860-866 ; Woronicz JD, et al., Science 1997 Oct 31;278(5339):866-869 ; Regnier CH, et al., Cell 1997 Jul 25;90(2):373-383) とホモロジーを持つ新規遺伝子であることが明らかになり、本発明者らはこの新規遺伝子がコードする蛋白質を I K K - i (i n d u c i b l e - I κ B k i n a s e) と命名した。

発明の開示

本発明は、免疫応答に関わる種々の遺伝子の発現を制御する転写因子 N F - κ B を活性化することができる新規のセリン／スレオニンキナーゼである新規 I κ B キナーゼ I K K - i、それをコードする遺伝子及びそれを含有してなる医薬組成物を提供する。

本発明者らは、I K K - i は I κ B - α をリン酸化し N F - κ B を活性化する新規セリン／スレオニンキナーゼであることを証明し、その発現が種々の炎症性サイトカインにより誘導されることを明らかにした。

本発明は、配列番号 2 若しくは 4 で表されるアミノ酸配列又は当該アミノ酸配列中の 1 個以上のアミノ酸が欠失し、他のアミノ酸で置換され、及び／又は、1 個以上の他のアミノ酸が付加されたアミノ酸配列を有し、転写因子 N F - κ B を活性化することができる蛋白質に関する。本発明の蛋白質は新規なセリン／スレオニンキナーゼである。

また、本発明は、前記の新規な蛋白質をコードする塩基配列を有する遺伝子に関する。より詳細には、本発明は、配列番号 1 又は 3 で表される塩基配列を有する遺伝子に関する。

さらに、本発明は、前記した蛋白質、及び、製薬上許容される担体からなる医薬組成物に関する。本発明の医薬組成物は、転写因子 N F - κ B を活性化することができ免疫応答機構に作用する。また本発明の医薬組成物は、I - T R A F 又は T R A F 分子が関与する疾患の予防、治療剤として有用である。

図面の簡単な説明

第 1 図は、L P S による刺激前 (-) と刺激後 (+) の I K K - i の m R N A

発現の誘導のノザンブロット解析の結果を示す図面に代わる写真である。図の下段はG 3 P D Hを用いた場合を示す。

第2図は、I K K - i のL P S刺激後のm R N A発現を時間の経過によりノザンブロット解析を行った結果を示す図面に代わる写真である。図の下段はG 3 P D Hを用いた場合を示す。

第3図は、ヒトI K K - i とマウスI K K - i のアミノ酸配列の比較を示す。図中の長方形で囲まれた部分は同一の配列を示し、[] の部分はキナーゼドメインを示し、*印はロイシンジッパードメインを示す。

第4図は、I K K - i とI K K - α 、I K K - β のアミノ酸配列の比較を示す。図中のバックをグレーに配色した部分は同一の配列を示し、[] の部分はキナーゼドメインを示し、長方形で囲んだ部分はアクチベーションループを示し、*印はキナーゼ活性に重要であると考えられるアミノ酸残基を示す。

第5図は、ノザンブロット解析による各臓器におけるI K K - i の発現を示した図面に代わる写真である。

第6図は、ノザンブロット解析によるB - 細胞とT - 細胞におけるI K K - i の発現を示した図面に代わる写真である。図の下段はG 3 P D Hを用いた場合を示す。

第7図は、ノザンブロット解析によるマウスの腫瘍株におけるI K K - i の発現を示した図面に代わる写真である。図の下段はエチジウムブロマイドで染色したトータルR N Aを示す。

第8図は、マウス腹腔マクロファージにおけるノザンブロット解析による種々の刺激によるI K K - i の誘導を示した図面に代わる写真である。図の下段はG 3 P D Hを用いた場合を示す。

第9図は、I K K - i の強制発現によるN F - κ Bレポーター遺伝子の活性化の結果を示したものである。図の下段は、タンパク量を抗F L A G抗体 (M 2) によるイミュノブロットにより評価した結果を示す図面に代わる写真である。

第10図は、インビトロでのI K K - i によるI κ B - α のリン酸化の結果を示した図面に代わる写真である。図の下段は、タンパク量を抗F L A G抗体 (M 2) によるイミュノブロットにより評価した結果である。

第11図は、IKK-iとI-TRAFの細胞内における複合体の形成を示す図面に代わる写真である。第11図のレーン1はFlag-IKK-iを、レーン2はMyc-I-TRAFを、レーン3はFlag-IKK-iとMyc-I-TRAFを示す。

第12図は、I-TRAFの欠失変異体を用いたKK-iとの結合領域の検索を示す図面に代わる写真である。第12図のレーン1は1-170断片を、レーン2は1-247断片を、レーン3は193-stop断片を、レーン4は全長(FL(Full length))をそれぞれ示す。

第13図は、IKK-iによるI-TRAFのリン酸化を示す図面に代わる写真である。第13図のレーン1、3及び5はFlag-IKK-iのみをトランスフェクションしたものを、レーン2、4及び6は両者をトランスフェクションしたものを示す。

第14図は、I-TRAFのリン酸化部位の検索の結果を示す図面に代わる写真である。第14図のレーン1及び5は1-170断片を、レーン2及び6は1-247断片を、レーン3及び7は193-stop断片を、レーン4及び8は全長(FL(Full length))をそれぞれ示す。

第15図は、精製GST-I-TRAFのIKK-iによるリン酸化を示す図面に代わる写真である。第15図のレーン1はFlag-IKK-iをトランスフェクションしたものを示し、レーン2は変異体IKK-i(K38A)をトランスフェクションしたものを示す。

発明を実施するための最良の形態

まず、本発明のIKK-iのcDNAクローニングについて説明する。

サブプレシヨンサブトラクティブハイブリダイゼーション法(suppression subtractive hybridization technique)を用いて、マクロファージ系腫瘍株であるRAW264.7のリボポリサッカライド(LPS)刺激における(+)群と(-)群との間でサブトラクションを施行し、LPS刺激により誘導されてくる遺伝子のスクリーニングを行った。MIP-1 α/β 、G-CSF、TNF- α などの既知遺伝子に加え、7つの新規遺伝子のフラグメントを得た。

このうちクローン#2F9は、刺激を加えないRAW264.7ではわずかに発現を認めるのみだが4時間のLPS刺激後、劇的に発現量が増加した(第1図参照)。第1図は、マクロファージ系腫瘍株RAW264.7をリボポリサッカライド(LPS)で刺激して誘導されてくる遺伝子のノザンプロット解析を示したものである。RAW264.7のLPS(100 ng/ml)刺激前(-)後(+)のポリ(A)⁺RNA 2 μ gを1%フォルムアミド-アガロースにて電気泳動し、ナイロンメンブレンに転写後、サブトラクションで得られたIKK- α のcDNAフラグメント(2F9)をプローブに用いてハイブリダイズさせた。RNA量が等量であることをG3PDHを用いて第1図の下段に示した。

また、このmRNAの発現の時間経過を調べると、LPS刺激後2時間から増加し始め、4時間でピークに達し24時間でもとのレベルに戻った(第2図参照)。

第2図は、RAW264.7を100 ng/mlのLPSで刺激し、各レーン上に示した時間の後にトータルRNAを抽出し25 μ gずつ1%フォルムアミド-アガロースにて電気泳動し、第1図の場合と同様にノザンプロット解析を行った結果を示したものである。プローブはマウスIKK- α (mIKK- α)のコーディング領域を用いた。RNA量が等量であることをG3PDHを用いて第2図の下段に示した。

RAW264.7を4時間LPS刺激して得たmRNAからcDNAライブラリーを作製し、2F9のフラグメントをプローブとしてこの遺伝子の全長を得た。この遺伝子は2154 bpのオープンリーディングフレーム(open reading frame)に718アミノ酸をコードしていた。ホモロジー検索の結果、データベース上では塩基配列のみが決定され、機能が未知のヒトcDNAクローンKIAA0151と最もホモロジーが高く、相同性はアミノ酸レベルで82.3%であり2F9はKIAA0151のマウスのカウンターパートであると考えられた。

KIAA0151に次いで相同性の高かった遺伝子は、最近同定されIKK- α をリン酸化しNF- κ Bを活性化することが明らかになったIKK- α , β (IKK- α , IKK- β)であり、キナーゼドメインの相同性はアミノ酸レベルでそれぞれ29.1%、30.1%であった。

2 F 9、K I A A 0 1 5 1にはともにN-末端にセリン／スレオニンキナーゼドメイン、中央にロイシンジッパードメインが2つ認められ、I K K- α 、I K K- β との構造の類似性と後に述べるこの分子の機能から、本発明者らはこの新規キナーゼを*i n d u c i b l e - I K K (I K K - i)*と命名した。

ヒトI K K-*i*とマウスI K K-*i*のアミノ酸配列の比較を第3図に、ヒトI K K-*i*、ヒトI K K- α 、ヒトI K K- β のアミノ酸配列の比較を第4図に示した。

第3図では、同一の配列を長方形で囲んでおり、キナーゼドメインを[]で示した。また、ロイシンジッパードメインの下に*印を記している。

第4図では、同一の配列のバックをグレーに配色し、キナーゼドメインを[]で示している。アクチベーションループを長方形で囲んでおり、アクチベーションループの配列でキナーゼ活性に重要であると考えられるアミノ酸残基の上に*印を記している。I K K- α 、I K K- β のヘリックスループ-ヘリックス構造の下にアンダーラインを引いている。

次に本発明者らは、各臓器におけるI K K-*i*の発現をノザンプロットで解析した。I K K- α 、I K K- β がどの組織にも普遍的に発現しているのに対しI K K-*i*のmRNAは脾臓、胸腺、末梢血白血球、脾臓、胎盤に特異的に多く発現していた(第5図参照)。第5図の各レーン上に記された臓器から得られたポリ(A)⁺RNA 2 μ gがプロットされたマルチティッシュノザンプロットメンブレン(Clonotech)を用いてノザンプロット解析を行った。プローブはヒトI K K-*i* (h I K K-*i*)のコーディング領域を用いた。

脾臓で認められるI K K-*i*の発現がどの細胞集団に由来するものなのかを調べるために、抗B 2 2 0抗体を使ってB-細胞とT-細胞を分離し、B-細胞はL P Sの刺激前(-)後(+)で、T-細胞はフォルボールエステルとカルシウムイオノフォアの刺激前(-)後(+)でそれぞれI K K-*i*の発現をノザン解析した。B-細胞ではL P S刺激しなければ検出できないが、L P S刺激により発現が誘導された。T-細胞では構成的に発現しているがフォルボールエステルとカルシウムイオノフォアの刺激により発現が低下した(第6図参照)。

第6図は、C 5 7 B L / 6から採取した脾細胞から抗体(B 2 2 0)を用いて、

高勾配磁気細胞分離装置 (high-gradient magnetic cell separation system) MACS (Miltenyi Biotec, Berg.-Gladbach, Germany) によってB-細胞とT-細胞を分離し、B-細胞はLPS: $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、T-細胞はイオノマイシン: $10 \mu\text{M}$ とPMA: $10 \text{ ng}/\text{ml}$ で4時間刺激し、各刺激の前後でトータルRNAを抽出し $20 \mu\text{g}$ ずつ、1%フォルムアミド-アガロースにて電気泳動し第2図の場合と同様にノザンプロット解析を行った。プローブはマウスIKK-i (mIKK-i) のコーディング領域を用いた。RNA量が等量であることをG3PDHを用いて第6図の下段に示した。

次に、いくつかのマウスの細胞株におけるIKK-iの発現をLPS刺激前(-)後(+)で解析した。5E3 (natural killer cell clone) とM1 (Monocytic leukemia cell line) においてLPS刺激によってIKK-iの発現が誘導された(第7図参照)。

第7図の各レーン上に記された腫瘍株NIH3T3 (fibroblast cell line)、EL-4 (thymoma cells)、5E3 (natural killer cell clone)、MOPC 315 (myeloma cells)、BCL-1 (B cell leukemia)、M1 (monocytic leukemia cell line) から、4時間のLPS ($100 \text{ ng}/\text{ml}$) 刺激前(-)後(+)でトータルRNAを抽出し第2図の場合と同様にノザンプロット解析を行った結果である。プローブはmIKK-iのコーディング領域を用いた。RNA量が等量であることを、エチジウムブロマイドで染色したトータルRNAの電気泳動像を用いて第7図の下段に示した。

さらに、LPS以外の刺激によってもIKK-iの発現が増強するのか否かを検討した。C57BL/6から採取した腹腔マクロファージをLPS、PMA、TNF- α 、IL-1 β 、IFN- γ 、IL-6によって4時間刺激した後にIKK-iの発現を見た。IKK-iはLPS以外にもTNF- α 、IL-1 β 、IFN- γ 、IL-6によっても発現が誘導されたがPMAによっては誘導されなかった(第8図参照)。

第8図は、C57BL/6から採取した腹腔マクロファージを、第8図の各レーン上に示した様にLPS: $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、PMA: $10 \text{ ng}/\text{ml}$ 、TNF- α : $100 \text{ ng}/\text{ml}$ 、IL-1 β : $100 \text{ ng}/\text{ml}$ 、IFN- γ : 250 U

/ml、IL-6:2000U/mlで刺激後トータルRNAを抽出し第2図の場合と同様にノザンプロット解析を行った結果を示したものである。プローブはmIKK-iのコーディング領域を用いた。RNA量が等量であることをG3PDHを用いて第8図の下段に示した。

IKK- α 、IKK- β は細胞内に強制発現させるとNF- κ Bを活性化することがレポータージーンアッセイにより証明されている。IKK-iにおいてもその構造の類似性からNF- κ Bを活性化する可能性があると考えことから、レポータージーンアッセイによりIKK-iのNF- κ B活性化能を検討した。

まず、IKK-iのN-末端にFLAGエピトープをタグしpEF-BOS発現ベクターに組み込んだ構築を作製した(pEF-BOS-FLAG-WT-IKK-i)。pEF-BOS-FLAG-IKK-iまたはベクターのみのコントロールをNF- κ Bのルシフェラーゼレポーターコンストラクトと293T細胞に一過性的にコトランスフェクションし、ルシフェラーゼ活性を測定した。この結果、IKK-iはその発現量依存性にNF- κ Bを活性化することが明らかになった(第9図参照)。

第9図は、293T細胞に、NF- κ Bコンセンサスシーケンスにルシフェラーゼ遺伝子をつないだレポーターコンストラクト(pNF- κ B-Luc)と、IKK-i遺伝子のN-末端にFLAGエピトープをタグしpEF-BOS発現ベクターにサブクローンしたコンストラクト(pEF-BOS-FLAG-WT-IKK-i)またはベクターのみのコントロールを一過性的にコトランスフェクションしルシフェラーゼ活性を測定した結果を示したものである。総DNA量はpEF-BOS-ベクターによって4 μ gに統一した。トランスフェクトしたpEF-BOS-FLAG-WT-IKK-iの量をグラフの下に示し、第9図の下段にタンパク量を抗FLAG抗体(M2)によるイミュノプロットにより評価したものを示す。

IKK- α 、IKK- β はインビトロでI κ B- α をリン酸化することが知られている。そこで、本発明のIKK-iが、I κ B- α のN-末端に存在する32番目と36番目のセリン残基をリン酸化するの可否かをインビトロキナーゼアッセイ(in vitro kinase assay)により解析した。

pEF-BOS-FLAG-WT-IKK-i又はIKK-iの38番目のリジンをアラニンに変化させたミュータントコンストラクト(pEF-BOS-FLAG-K38A-IKK-i)を298T細胞に一過性にトランスフェクションした。24時間後に発現されたIKK-iタンパクまたはK38A-IKK-iタンパクを抗FLAG抗体(M2)によって免疫沈降により精製し、インビトロキナーゼアッセイに用いた。

基質として、I κ B- α のアンキリンリピートよりC-末端をとりのぞいたGST-I κ B- α Nタンパク(WT)、またはGST-I κ B- α Nの32番目と36番目のセリン残基をどちらもアラニンに変えたGST-I κ B- α Nタンパク(AA)を用いた。約80kDaにIKK-iの自己リン酸化のバンドがBOS-FLAG-WT-IKK-iのレーンに認められた。IKK-iはGST-I κ B- α Nタンパク(WT)をリン酸化したが、K38A-IKK-iはGST-I κ B- α Nタンパク(WT)をリン酸化しなかった。また、IKK-iはGST-I κ B- α Nタンパク(AA)を全くリン酸化しなかった(第10図参照)。

第10図は、インビトロ(in vitro)でのIKK-iによるI κ B- α のリン酸化の結果を示したものである。293T細胞にpEF-BOS-MOCKまたはpEF-BOS-FLAG-WT-IKK-iまたは38番目のリジンをアラニンに変化させたミュータントコンストラクト(pEF-BOS-FLAG-K38A-IKK-i)を一過性的にトランスフェクションした。24時間後に発現されたIKK-iタンパクまたはK38A-IKK-iタンパクを抗FLAG抗体(M2)によって免疫沈降により精製し、インビトロキナーゼアッセイに用いた。基質としてI κ B- α のアンキリンリピートよりC-末端をとりのぞいたGST-I κ B- α Nタンパク(WT)、またはGST-I κ B- α Nの32番目と36番目のセリン残基をどちらもアラニンに変えたタンパク(AA)を大腸菌に発現させグルタチオンセファロースで精製したものをを用いた。IKK-iまたはK38A-IKK-iと基質と[γ - 32 P]ATPを30℃、20分間反応させた後SDS-PAGEに展開後オートラジオグラフィにて評価した。矢印で自己リン酸化のバンドとGST-I κ B- α Nのバンドを示した。分子量(単位

kDa) を左に示した。第10図の下段にタンパク量を抗FLAG抗体(M2)によるイミュノブロットにより評価した結果を示した。

以上の結果から、本発明のIKK-iは、NF- κ Bの活性化に重要なIKBのN-末端に存在するセリン残基をリン酸化することが明らかになった。

本発明のIKK-iのcDNAクローニングの結果明らかにされた塩基配列及びそのアミノ酸配列を配列表に示す。配列番号1はヒトIKK-i(hIKK-i)の塩基配列を示しており、配列番号2はhIKK-iのアミノ酸配列を示している。また、配列番号3はマウスIKK-i(mIKK-i)の塩基配列を示しており、配列番号4はmIKK-iのアミノ酸配列を示している。

本発明のIKK-iは、N-末端にキナーゼドメインを、中央にロイシンジッパードメインを有する新規のセリン/スレオニンキナーゼであり、そのmRNAの発現はマクロファージにおいてLPS刺激によって誘導されることが明らかになった。本発明のIKK-iのアミノ酸配列は、IKBをリン酸化し、NF- κ Bを活性化するIKK- α 、IKK- β と高い相同性を示した。

本発明のIKK-iは、脾臓、胸腺、末梢血白血球などに構成的に発現しており、脾臓ではT-細胞に構成的に発現していた。またB-細胞、腹腔マクロファージ、ナチュラルキラー(natural killer)細胞、モノサイト系腫瘍株をLPS刺激すると発現が増強し、腹腔マクロファージをTNF- α 、IL-1 β 、IFN- γ 、IL-6で刺激することによっても発現が増強した。これらのノザンブロット解析の結果から、IKK-iの発現が、主に免疫担当細胞や炎症反応に関わる細胞に偏っており、炎症性の刺激により増強したことからIKK-iは炎症反応に関わる分子であると考えられる。

IKK-iのNF- κ B活性能をレポータージーンアッセイによって解析したところ、293T細胞にIKK-iを強制発現すると蛋白量依存性にNF- κ Bが活性化されることが明らかになった。IKK-iはIKK- α 、IKK- β と同様にIKB- α のN-末端に存在するセリン残基をリン酸化することがインビトロキナーゼアッセイで明らかになったので、レポータージーンアッセイで観察されたNF- κ B活性能は、IKK-iがIKB- α のN-末端をリン酸化することに依存するものであると考えられた。IKK-iは免疫担当細胞において炎

症性の刺激により発現が誘導され、NF- κ Bを活性化する新規なIKKキナーゼであることがわかった。

本発明のIKK-iは、LPS刺激2時間後から発現量が増加すること、発現量依存性にNF- κ Bを活性化することから、LPS刺激によるNF- κ Bの活性化の維持に貢献している可能性がある。IKK-iはIKK- α 、IKK- β と比べその発現が免疫担当細胞に偏っているため、そのインヒビターの開発は免疫系特異的にNF- κ Bの活性化を抑制できる可能性があり、IKK-iのコントロールは炎症性疾患の治療に貢献できることになる。

さらに、本発明のIKK-iと相互作用する分子を単離するため、酵母ツーハイブリッド法を行った。ヒトIKK-iのアミノ酸541～716番目をGAL4 DNA結合領域(Binding Domain)とのキメラタンパク質が発現できるようpAS2-1プラスミドに組み込みベイトプラスミドを作製した。これを酵母Y190株に形質転換を行い選択培地上で生育を行った。さらに得られた転換体に、GAL4活性化領域(Activation Domain)とのキメラタンパク質を発現することが可能なヒトB細胞由来のcDNAライブラリーを含むpACT2プラスミドで形質転換を行った。選択培地上で生育を行い、得られた陽性クローンよりプラスミドを回収し、最終的にDNAシーケンスにより塩基配列の決定を行った。ホモロジー検索の結果、10クローンが既に配列が報告されているI-TRAF/TANKと同一であった。

そこで、実際に細胞内においてIKK-iとI-TRAFが結合するかどうかを検討した。まず哺乳細胞内で発現可能な発現ベクターを構築した。ヒトIKK-iのN-末端側にFlagをエピトープとして付加し、発現ベクターpEF-BOSに組み込んだ。またヒトI-TRAFのN-末端側にMycをエピトープとして付加し、発現ベクターpEF-BOSに組み込んだ。これらをサル腎臓細胞株であるCOS-7細胞にリポフェクション法によりトランスフェクションを行った。24時間後、細胞を1.0%のNonidet P-40を含むバッファーで可溶化した。可溶化物を抗Flag抗体あるいは抗Myc抗体で免疫沈降し、その後可溶化物を抗Myc抗体あるいは抗Flag抗体でウェスタンブロット解析を行った。

その結果を第11図に示す。第11図のレーン1はFlag-IKK-iを、レーン2はMyc-I-TRAFを、レーン3はFlag-IKK-iとMyc-I-TRAFを示す。抗Myc抗体で免疫沈降されるFlag-IKK-i（第11図上、レーン3）と抗Flag抗体で共免疫沈降されるMyc-I-TRAF（第11図中下、レーン3）とのバンドが特異的に検出された。従って、両分子が哺乳細胞内においても複合体を形成していることが明かとなった。また各レーンにおける発現量は抗Myc抗体、あるいは抗Flag抗体での免疫沈降物を抗Myc抗体、あるいは抗Flag抗体でウェスタンブロット解析を行うことにより確認することができる（第11図、中上、下）。

次にI-TRAFのどの領域を介してIKK-iと結合しているかを上記と同様の手法を用いて検討した。まず3種類のI-TRAF欠失変異体を作製した。N-末端にMycを付加したヒトI-TRAFのアミノ酸配列の1～170、1～247あるいは193～C末端(stop)までの断片をpEF-BOSに組み込んだ。これらをCOS-7細胞にFlag-IKK-iと共にトランスフェクションを行った。24時間後に細胞を可溶化し、可溶化物を抗Myc抗体で免疫沈降後、抗Flag抗体でウェスタンブロット解析を行った。

その結果を第12図に示す。第12図のレーン1は1～170断片を、レーン2は1～247断片を、レーン3は193～stop断片を、レーン4は全長(FL(Full length))をそれぞれ示す。これらを発現させた細胞において、抗Myc抗体で免疫沈降されるFlag-IKK-iのバンドが検出された（第12図上）。従ってI-TRAFはN-末端側の170アミノ酸を介してIKK-iと結合していることが明らかとなった。また各レーンにおけるタンパク質の発現量は、可溶化物を抗Flag抗体（第12図中）、あるいは抗Myc抗体（第12図下）でウェスタンブロット解析を行うことにより確認した。

次に、I-TRAFがIKK-iによりリン酸化を受ける基質かどうかを検討した。COS-7細胞にFlag-IKK-iとMyc-I-TRAFをトランスフェクションし、24時間後可溶化した。可溶化物を抗Flag抗体あるいは抗Myc抗体で免疫沈降を行った後、沈降物にキナーゼバッファーと $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ を加え反応し、インビトロキナーゼアッセイを行った。

結果を第13図に示す。レーン1、3及び5はFlag-IKK-iのみをトランスフェクションしたものを、レーン2、4及び6は両者をトランスフェクションしたものを示す。この結果から、抗Flag(レーン2)および抗My c抗体(レーン4)のいずれの免疫沈降物中において、My c-I-T R A Fのリン酸化のバンドが検出された。従ってMy c-I-T R A FはIKK-iによりリン酸化される基質であることが明らかとなった。また各レーンにおけるタンパク質の発現量は、可溶化物を抗Flag抗体(第13図のレーン5、6上)、あるいは抗My c抗体(第13図のレーン5、6下)でウェスタンブロット解析を行うことにより確認した。

次に、I-T R A Fのどの領域がリン酸化を受けるか検討した。My c-I-T R A Fの欠失変異体(1~170断片、1~247断片、193~stop断片、全長(FL))をIKK-iと共にCOS-7細胞にトランスフェクションし、可溶化物を得た。その後、抗Flag抗体あるいは抗My c抗体で免疫沈降し、インビトロキナーゼアッセイを行った。

結果を第14図に示す。第14図のレーン1及び5は1~170断片を、レーン2及び6は1~247断片を、レーン3及び7は193~stop断片を、レーン4及び8は全長(FL(Full length))をそれぞれ示す。この結果からFL(レーン4、8)に加えMy c-I-T R A F(1~247)(レーン2、6)のリン酸化が認められた。従って少なくともI-T R A Fの171~247内にIKK-iによりリン酸化を受ける部位が存在していると考えられる。

さらに、I-T R A Fの精製タンパク質を用いて、これがIKK-iによりリン酸化を受けるかどうか検討した。まずI-T R A Fタンパク質の精製を行った。ヒトI-T R A F cDNAを大腸菌内でグルタチオンSトランスフェラーゼ(GST)とのキメラタンパク質として発現可能な発現プラスミドpGEX-5X-1に組み込んだ。得られたベクターを大腸菌DH5 α に形質転換を行った。大腸菌をLB液体培地にて終夜培養後、IPTGを添加し3時間後に回収した。大腸菌をPBSで溶かし超音波処理により破碎した。これにTriton X-100を1%になるように加え可溶化後、グルタチオンセファロースを加え1時間反

応させた。グルタチオンセファロースに結合したGST-I-TRAFタンパク質をグルタチオン溶液で溶出し、精製タンパク質として実験に用いた。次にCOS-7細胞にFlag-IKK-iをトランスフェクションした。同時に変異体IKK-i (K38A)を作製しトランスフェクションを行った。K38A変異体はATP結合部位と考えられるキナーゼドメイン内に存在する38番目のリジンをアラニンへ置換したものであり、多くのキナーゼはこの部位の変異によりキナーゼ活性を失うことが知られている。トランスフェクション24時間後に細胞を可溶化し、抗Flag抗体で免疫沈降を行った。免疫沈降物中に精製したGST-I-TRAFを1.0 μ g加えてインビトロでリン酸化反応を行い、キナーゼアッセイを行った。

その結果を第15図に示す。第15図のレーン1はFlag-IKK-iをトランスフェクションしたものを示し、レーン2は変異体IKK-i (K38A)をトランスフェクションしたものを示す。このようにFlag-IKK-iを発現させた細胞でGST-I-TRAFのリン酸化が認められた(第15図のレーン1の上)。一方、K38A変異体ではリン酸化は認められなかった(第15図のレーン2の上)。従ってI-TRAFはIKK-iによりリン酸化される基質であることが明らかとなった。また、K38Aが細胞内において発現していることは、可溶化物を抗Flag抗体でウェスタンブロット解析を行うことで確認した(第15図の下)。

これらの結果、IKK-iがI-TRAFとも結合することが明らかとなった。さらにインビトロキナーゼアッセイによりI-TRAFがIKK-iによりリン酸化を受ける特異的基質であることが明らかとなった。I-TRAFは当初TRAF2およびTRAF3に結合する分子として同定された分子である。TRAF分子は現在6種類同定されており、様々なレセプターに結合するアダプター分子として機能していることが知られている。特にTRAF分子はアポトーシスに関連するTNFレセプターやCD40と結合するものであり、これらのレセプター類のシグナル伝達系物質として知られている。

TRAF分子はリカンドの刺激によりレセプターと複合体を形成し活性化されるが、活性化されていない状態では細胞質内においてI-TRAFと結合するこ

とにより活性化が負に制御されていると考えられている。従って I K K - i は I - T R A F をリン酸化することで T R A F 分子の活性化に間接的に関与していると考えられる。

以上のように、本発明の I K K - i はアポトーシスなどに関連する T R A F 分子の活性化に関与していることから、T R A F 分子に関連するアポトーシス関連疾患の予防、治療、制御などに有用となる。

このように I K K - i は臨床的な観点からも非常に興味深い分子であると考えられる。本発明の医薬組成物は、I K K - i と製薬上許容される担体とからなるものであり、投与可能な形態として投与することができる。投与量は患者の状態に応じて適宜選択することができる。

本発明の医薬組成物は、免疫応答機能の改善や炎症性疾患の治療に有効である。

また、本発明においては、I K K - i 遺伝子に対するアンチセンスを本発明の医薬組成物の成分として使用することも包含するものである。

実施例

次に実施例により本発明をより具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

実施例 1 (m I K K - i の c D N A クローニング)

サブプレシヨンサブトラクティブハイブリダイゼーション法 (suppression subtractive hybridization technique) を用いて、マクロファージ系腫瘍株である R A W 2 6 4 . 7 の L P S 1 0 0 n g / m l での刺激 (+) 群と (-) 群との間でサブトラクションを施行し、L P S 刺激により誘導されてくる遺伝子のスクリーニングを行った。

その結果、M I P - 1 α / β 、G - C S F、T N F - α などの既知遺伝子に加え、7つの新規遺伝子のフラグメントを得た。7つの新規遺伝子のうちクローン # 2 F 9 は 3 7 4 b p の遺伝子断片であった。クローン # 2 F 9 の遺伝子の全長を得るため、我々はまず、R A W 2 6 4 . 7 を 4 時間 L P S 刺激して得た m R N A から λ Z A P ファージを用いて c D N A ファージライブラリーを作製した。2

F 9 の 3 7 4 b p のフラグメントをランダムラベリング法にて α - 32 P-d C T P で標識し、標識された 2 F 9 をプローブとして、c D N A フェージライブラリーをスクリーニングして遺伝子の全長を得た。

得られたクローンの全長は 2 9 1 0 b p であった。この遺伝子は 2 1 5 1 b p のオープンリーディングフレーム (open readin frame) に 7 1 7 個のアミノ酸をコードしていた。この遺伝子の塩基配列を配列番号 3 に示す。また、そのアミノ酸配列を配列番号 4 に示す。

実施例 2 (h I K K - i の c D N A クローニング)

既に D D B J に登録されていた塩基配列 K I A A 0 1 5 1 をもとにして、ヒト胎盤の c D N A ライブラリーをテンプレートとして P C R 法により、ヒトの I K K - i の c D N A をクローニングした。このときの P C R 法に用いたプライマーの配列は、

5'-ctttgcctgactcagggcagctcagag-3'、及び、

5'-atggtgcagaagagcagtggttgaatc-3'

であった。

この遺伝子は、2 1 4 8 b p のオープンリーディングフレーム (open readin frame) に 7 1 6 個のアミノ酸をコードしていた。この遺伝子の塩基配列を配列番号 1 に示す。また、そのアミノ酸配列を配列番号 2 に示す。

実施例 3 (L P S 刺激によるクローン # 2 F 9 の発現)

マクロファージ系腫瘍株 R A W 2 6 4 . 7 をリボポリサッカライド (L P S) で刺激して誘導されてくる遺伝子のノサンプロット解析を行った。

R A W 2 6 4 . 7 の L P S (1 0 0 n g / m l) 刺激前 (-) 後 (+) のポリ (A)⁺ R N A 2 μ g を 1 % フォルムアミド-アガロースにて電気泳動し、ナイロンメンブレンに転写後、サブトラクションで得られた I K K - i の c D N A フラグメントをプローブに用いてハイブリダイズさせた。

結果を第 1 図に示す。なお、R N A 量が等量であることを G 3 P D H を用いて第 1 図の下段に示した。

実施例4 (LPS刺激によるクローン#2F9の発現の時間経過)

RAW264.7を100 ng/mlのLPSで刺激し、0.5時間、2時間、4時間、8時間、12時間、及び、24時間経過後にトータルRNAを抽出し、25 µgずつ1%フォルムアミド-アガロースにて電気泳動し、実施例3と同様にノザンプロット解析を行った。プローブは実施例2で得られたマウスIKK-i (mIKK-i) のコーディング領域を用いた。

結果を第2図に示す。なお、RNA量が等量であることをG3PDHを用いて第2図の下段に示した。

実施例5 (IKK-iの発現)

各臓器におけるIKK-iの発現をノザンプロットで解析した。

各臓器から得られたpoly(A)⁺RNA 2 µgがプロットされたマルチティッシュノザンプロットメンブレン (Clontech) を用いてノザンプロット解析を行った。プローブはhIKK-iのコーディング領域を用いた。

結果を第5図に示す。第5図中の矢印は、IKK-iの位置を示している。

実施例6 (脾臓におけるIKK-iの発現)

C57BL/6から採取した脾細胞から抗体(B220)を用いて、高勾配磁気細胞分離装置 (high-gradient magnetic cell separation system) MACS (Miltenyi Biotec, Berg.-Gladbach, Germany) によってB-細胞とT-細胞を分離した。B-細胞はLPS: 100 µg/ml、T-細胞はイオノマイシン: 10 µMとPMA: 10 ng/mlで4時間刺激し、各刺激の前後でトータルRNAを抽出し20 µgずつ1%フォルムアミド-アガロースにて電気泳動させて、実施例4と同様にノザンプロット解析を行った。プローブはmIKK-iのコーディング領域を用いた。

結果を第6図に示す。なお、RNA量が等量であることをG3PDHを用いて第6図の下段に示した。

実施例 7 (マウスの細胞における I K K - i の発現)

マウスの細胞株、腫瘍株 N I H 3 T 3 (fibroblast cell line)、E L - 4 (thymoma cells)、5 E 3 (natural killer cell clone)、M O P C 3 1 5 (myeloma cells)、B C L - 1 (B cell leukemia)、及び、M 1 (monocytic leukemia cell line) のそれぞれに、L P S (1 0 0 n g / m l) 刺激前 (-) 及び 4 時間の L P S 刺激後 (+) のトータル R N A を抽出し、実施例 4 と同様にノザンブロット解析を行った。プローブは m I K K - i のコーディング領域を用いた。

結果を第 7 図に示す。なお、R N A 量が等量であることを、エチジウムブロマイドで染色したトータル R N A の電気泳動像を用いて第 7 図の下段に示した。

実施例 8 (腹腔マクロファージにおける I K K - i の発現)

C 5 7 B L / 6 から採取した腹腔マクロファージを、L P S : 1 μ g / m l、P M A : 1 0 n g / m l、T N F - α : 1 0 0 n g / m l、I L - 1 β : 1 0 0 n g / m l、I F N - γ : 2 5 0 U / m l、I L - 6 : 2 0 0 0 U / m l でそれぞれ刺激した後、トータル R N A を抽出し、実施例 4 と同様にノザンブロット解析を行った。プローブは m I K K - i のコーディング領域を用いた。

結果を第 8 図に示す。第 8 図中の (-) は刺激をしなかった場合を示している。

なお、R N A 量が等量であることを G 3 P D H を用いて第 8 図の下段に示した。

実施例 9 (I K K - i 発現ベクターの構築)

I K K - i 遺伝子の N - 末端に F L A G エピトープを結合させた。F L A G - h I K K - i フラグメントの 5' 端と 3' 端に制限酵素 S a l I サイトをつくり、次に示すプライマー配列 1 (1) 及び (2) を用いて、P C R 法にて作成した。

(1) 5'-gggtcgacca ccattgacta caaggacgac gatgacaaga tgcagagcac agccaat-3'

(2) 5'-gtcgactcag accatcagga ggtgc-3'

これを T - ベクター (p G E M - T) (P r o m e g a) にサブクローン後、制限酵素 S a l I で切り出して、p E F - B O S 発現ベクターへサブクローンして、発現ベクター p E F - B O S - F L A G - W T - I K K - i を構築した。

実施例 10 (IKK- α による NF- κ B の活性化)

293T細胞 3×10^5 個に、NF- κ B コンセンサスレポーターコンストラクト (pNF- κ B-Luc) (Stratagene 社製) と、実施例 9 で得た IKK- α 発現ベクター pEF-BOS-FLAG-WT-IKK- α を、それぞれ $0 \mu\text{g}$ (添加無し)、 $0.3 \mu\text{g}$ 、 $1.0 \mu\text{g}$ 、 $3.0 \mu\text{g}$ 加えて、一過性的にトランスイット LT-1 (Transit LT-1) (Pan Vera Corporation 社製) を用いたリポフェクション法によりコトランスフェクションし、プロメガ (Promega) 社製のデュアルルシフェラーゼレポーターアッセイシステム (Dual Luciferase Reporter assay system) を用いて、ルシフェラーゼ活性を測定した。なお、コントロールとしてベクターのみを添加したものを示した。

総 DNA 量は pEF-BOS-ベクターによって $4 \mu\text{g}$ に統一した。

結果を第 9 図に示す。なお、第 9 図の下段にタンパク量を抗 FLAG 抗体 (M2) によるイミュノブロットにより評価したものを示した。

実施例 11 (IKK- α の 38 番目のリジンをアラニンにした変異体の製造)

ポイントミューテーションにより、IKK- α の 38 番目のリジンをコードしている塩基を、アラニンをコードする塩基にして、IKK- α の変異体の遺伝子を作成した。ポイントミューテーションは、トランスフォーマー・サイト・ディレクティッドミュータゲネシスキット (Clontech) を用いた。

実施例 12 (IKK- α の変異体の発現ベクターの構築)

実施例 11 で得た変異体の遺伝子を用いて、実施例 9 と同様にして変異体の発現ベクター pEF-BOS-FLAG-K38A-IKK- α を構築した。

実施例 13 (GST-I κ B- α N タンパク (WT) の製造)

I κ B- α のアンキリンリピートより C-末端部分を切断したアミノ酸配列 1~72 をコードする遺伝子を製造し、これを大腸菌で発現させ、グルタチオンセファロースで精製して GST-I κ B- α N タンパク (WT) を得た。ベクター

としてはファルマシア社製の p G E X 2 T を用いた。

実施例 14 (G S T-I κ B- α Nタンパク (A A) の製造)

G S T-I κ B- α N の 32 番目と 36 番目のセリン残基をどちらもアラニンをコードする塩基に変えた遺伝子を製造して、これを大腸菌で発現させ、グルタチオンセファロースで精製した G S T-I κ B- α Nタンパク (A A) を得た。

実施例 15 (I K K-i による I κ B- α のセリン残基をリン酸化)

293T細胞 2×10^6 個に、p E F-B O S-M O C K、実施例 9 で得た p E F-B O S-F L A G-W T-I K K-i、又は、実施例 12 で得たミュータントコンストラクト (p E F-B O S-F L A G-K 38 A-I K K-i) をそれぞれ用いて、10cm ディッシュ (d i s h) 上で一過性的にトランスフェクションした。24時間後に発現された I K K-iタンパクまたは K 38 A-I K K-iタンパクを抗 F L A G抗体 (M 2) によって免疫沈降により精製し、インビトロキナーゼアッセイを行った。

インビトロキナーゼアッセイの基質として、実施例 14 で得た G S T-I κ B- α Nタンパク (W T)、又は、実施例 15 で得たタンパク (A A) を用いた。I K K-i または K 38 A-I K K-i と基質と $[\gamma-^{32}\text{P}]$ A T P を 30°C、20 分間反応させた後 S D S-P A G E に展開後オートラジオグラフィにて評価した。

結果を第 10 図に示す。第 10 図中の約 80 k D a の位置の矢印は、自己リン酸化のバンドを示し、その下の矢印は G S T-I κ B- α N のバンドを示す。分子量 (単位 k D a) を第 10 図の左側に示している。なお、第 10 図の下段にタンパク量を抗 F L A G抗体 (M 2) によるイミュノプロットにより評価した結果を示した。

この結果、I K K-i は G S T-I κ B- α Nタンパク (W T) をリン酸化したが、K 38 A-I K K-i は G S T-I κ B- α Nタンパク (W T) をリン酸化しなかった。また、I K K-i は G S T-I κ B- α Nタンパク (A A) を全くリン酸化しなかった。

実施例 16 (酵母ツーハイブリッド法による I K K - i と相互作用する分子の単離)

ヒト I K K - i のアミノ酸 541 ~ 716 番目を G A L 4 DNA バインディングドメイン (Binding Domain) とのキメラタンパク質が発現できるよう p A S 2 - 1 プラスミドに組み込みベイトプラスミドを作製した。これを酵母 Y 190 株に形質転換を行い選択培地上で生育を行った。さらに得られた転換体に G A L 4 アクティベーションドメイン (Activation Domain) とのキメラタンパク質を発現することが可能なヒト B 細胞由来の c D N A ライブラリーを含む p A C T 2 プラスミドを形質転換を行った。選択培地上で生育を行い、得られた陽性クローンよりプラスミドを回収し、最終的に D N A シーケンスにより塩基配列の決定を行った。ホモロジー検索の結果、10 クローンが既に配列が報告されている I - T R A F / T A N K と同一であった。

実施例 17 (細胞内における I K K - i と I - T R A F の結合)

ヒト I K K - i の N - 末端側に F l a g をエピトープとして付加し、発現ベクター p E F - B O S に組み込んだ。

また、ヒト I - T R A F の N - 末端側に M y c をエピトープとして付加し、発現ベクター p E F - B O S に組み込んだ。

さらに、ヒト I K K - i の N - 末端側に F l a g をエピトープとして付加し、これにヒト I - T R A F の N - 末端側に M y c をエピトープとして付加して、発現ベクター p E F - B O S に組み込んだ。

これらをサル腎臓細胞株である C O S - 7 細胞にリポフェクション法によりトランスフェクションを行った。24 時間後、細胞を 1.0 % の N o n i d e t P - 40 を含むバッファーで可溶化して、可溶化物を抗 F l a g 抗体あるいは抗 M y c 抗体で免疫沈降し、その後可溶化物を抗 M y c 抗体あるいは抗 F l a g 抗体でウェスタンブロット解析を行った。

結果を第 11 図に示す。レーン 1 は F l a g - I K K - i を、レーン 2 は M y c - I - T R A F を、レーン 3 は F l a g - I K K - i と M y c - I - T R A F

を示す。

実施例 18 (I-TRAF の IKK-i との結合領域の決定)

まず、N-末端に Myc を付加した、ヒト I-TRAF のアミノ酸配列 1~170、1~247 あるいは 193~stop 断片からなる 3 種類の I-TRAF 欠失変異体を作製した。これをそれぞれ pEF-BOS に組み込んだ。これらを COS-7 細胞に Flag-IKK-i と共にトランスフェクションを行った。24 時間後に細胞を可溶化し、可溶化物を抗 Myc 抗体で免疫沈降後、抗 Flag 抗体でウェスタンブロット解析を行った。

その結果を第 12 図に示す。第 12 図中、レーン 1 は 1~170 断片、レーン 2 は 1~247 断片、レーン 3 は 193~stop 断片、レーン 4 は全長 (Full length) を示す。

実施例 19 (I-TRAF の IKK-i によるリン酸化の確認)

COS-7 細胞に Flag-IKK-i と Myc-I-TRAF をトランスフェクションし、24 時間後可溶化した。可溶化物を抗 Flag 抗体あるいは抗 Myc 抗体で免疫沈降を行った後、沈降物にキナーゼバッファーと [γ - 32 P] ATP を加え反応し、インビトロキナーゼアッセイを行った。

結果を第 13 図に示す。レーン 1、3 及び 5 は Flag-IKK-i のみをトランスフェクションしたものを、レーン 2、4 及び 6 は両者をトランスフェクションしたものを示す。

ように抗 Flag (レーン 2) および抗 Myc 抗体 (レーン 4) のいずれの免疫沈降物中において、Myc-I-TRAF のリン酸化のバンドが検出された。従って Myc-I-TRAF は IKK-i によりリン酸化される基質であることが明らかとなった。また各レーンにおけるタンパク質の発現量は可溶化物を抗 Flag 抗体 (レーン 5、6 上)、あるいは抗 Myc 抗体 (レーン 5、6 下) でウェスタンブロット解析を行うことにより確認した。

実施例 20 (I-TRAF のリン酸化領域の決定)

Myc-I-TRAFの欠失変異体(1-170、1-247、193-stop、FL)をIKK-iと共にCOS-7細胞にトランスフェクションし、可溶化物を得た。その後、抗Flag抗体あるいは抗Myc抗体で免疫沈降し、インビトロキナーゼアッセイを行った。

結果を第14図に示す。第14図のレーン1及び5は1-170断片を、レーン2及び6は1-247断片を、レーン3及び7は193-stop断片を、レーン4及び8は全長(FL(Full length))をそれぞれ示す。

実施例21 (I-TRAFタンパク質のIKK-iによるリン酸化)

ヒトI-TRAF cDNAを大腸菌内でグルタチオンSトランスフェラーゼ(GST)とのキメラタンパク質として発現可能な発現プラスミドpGEX-5X-1に組み込んだ。得られたベクターを大腸菌DH α に形質転換を行った。大腸菌をLB液体培地にて終夜培養後、IPTGを添加し3時間後に回収した。大腸菌をPBSで溶かし超音波処理により破碎した。これにTriton X-100を1%になるように加え可溶化後、グルタチオンセファロースを加え1時間反応させた。グルタチオンセファロースに結合したGST-I-TRAFタンパク質をグルタチオン溶液で溶出し、精製タンパク質として実験に用いた。

次にCOS-7細胞にFlag-IKK-iをトランスフェクションした。同時に変異体IKK-i(K38A)を作製しトランスフェクションを行った。

トランスフェクション24時間後に細胞を可溶化し、抗Flag抗体で免疫沈降を行った。免疫沈降物中に精製したGST-I-TRAFを1.0 μ g加えてインビトロでリン酸化反応を行い、キナーゼアッセイを行った。

その結果を第15図に示す。Flag-IKK-iを発現させた細胞でGST-I-TRAFのリン酸化が認められた(レーン1上)。一方、K38A変異体ではリン酸化は認められなかった(レーン2上)。また、K38Aが細胞内において発現していること可溶化物を抗Flag抗体でウェスタンブロット解析を行うことで確認した(第15図下)。

産業上の利用可能性

本発明は、免疫応答に関わる種々の遺伝子の発現を制御する転写因子NF- κ Bを活性化することができる新規のセリン／スレオニンキナーゼである新規I κ BキナーゼIKK-i、それをコードする遺伝子及びそれを含有してなる医薬組成物を提供するものである。本発明のIKK-iはI κ B- α をリン酸化しNF- κ Bを活性化することから、この遺伝子を制御することは、免疫応答機構の改善や炎症性疾患の治療に有用である。さらに、本発明のIKK-iはI-TRAFに結合し、これをリン酸化することから、アポトーシスなどに関連するTRAF分子の活性制御に有用である。

請 求 の 範 囲

1. 配列番号 2 若しくは 4 で表されるアミノ酸配列又は当該アミノ酸配列中の 1 個以上のアミノ酸が欠失し、他のアミノ酸で置換され、及び／又は、1 個以上の他のアミノ酸が付加されたアミノ酸配列を有し、転写因子 NF- κ B を活性化することができる蛋白質。
2. セリン／スレオニンキナーゼである請求の範囲第 1 項に記載の蛋白質。
3. I-TRAF に結合し、I-TRAF をリン酸化する活性を有する請求の範囲第 1 項又は第 3 項に記載の蛋白質。
4. 請求の範囲第 1 項に記載の蛋白質をコードする塩基配列を有する遺伝子。
5. 塩基配列が、配列番号 1 又は 3 で表される塩基酸配列を有する請求の範囲第 4 項に記載の遺伝子。
6. 請求の範囲第 1 項～第 3 項のいずれかに記載の蛋白質、及び、製薬上許容される担体からなる医薬組成物。
7. 免疫応答機構に作用する請求の範囲第 6 項に記載の医薬組成物。
8. I-TRAF 又は TRAF 分子が関与する疾患の予防、治療剤である請求の範囲第 6 項に記載の医薬組成物。

第 1 図

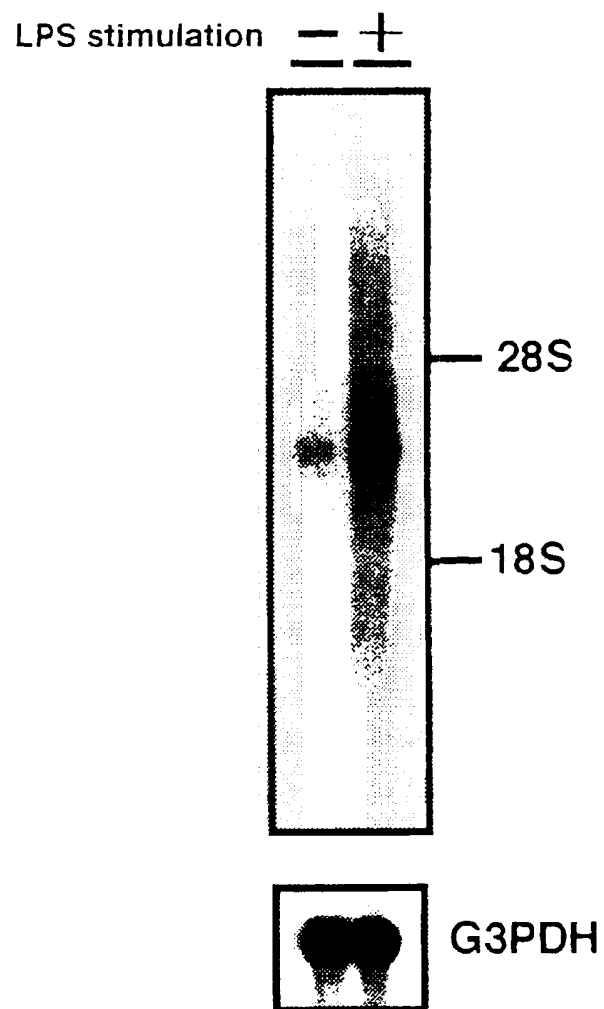
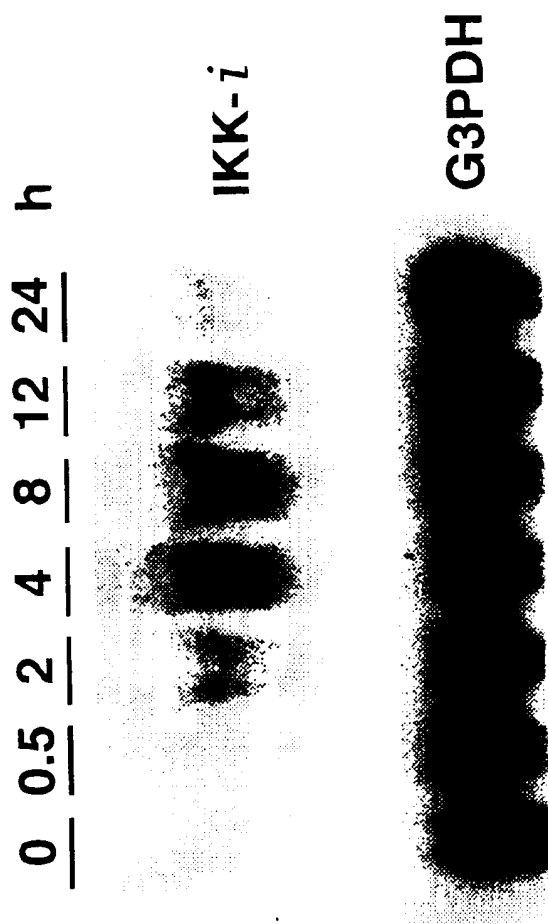


図 2



第 3 頁

h i k k - i 1 : M Q S T A N Y I W H T D D D L L G Q G A T A S V Y K A R N K K S G E L V A V K V F N T T S Y L R P P R E V Q V R E F E V L R K L N H Q N I V K L F A V E E 75
 m i k k - i 1 : M Q S T A N Y I W H T D D D L L G Q G A T A S V Y K A R N K K S G E V V A V K V F N S A S Y R P P E V Q V R E F E V L R R L N H Q N I V K L F A V E E 75

 h i k k - i 76 : T G G S R Q K V L V M E Y C S S G S L L S V L E S P E N A F G L P E D E F L V V L R C V V A G M N H L R E N G I V H R D I K P G N I M R L V G E E G Q 150
 m i k k - i 76 : T G G S R Q K V L I M E Y C S S G S L L S V L E D P E N T E F G L S E E F L V V L R C V V A G M N H L R E N G I V H R D I K P G N I M R L V G E E G Q 150

 h i k k - i 151 : S I Y K L T D F G A A R E L D D D E K F V S V Y G T E E Y L H P D M Y E R A V L R K P Q K A F G V T V D L W S I G V T L Y H A A T G S L P F I P F G 225
 m i k k - i 151 : S I Y K L S D F G A A R K L D D D E K F V S V Y G T E E Y L H P D M Y E R A V L R K P Q K A F G V T V D L W S I G V T L Y H A A T G S L P F I P F G 225

 h i k k - i 226 : G P R R N K E I M Y R I T T E K P A G A I A E A Q R R E N G P L E W S Y T E P I T C Q L S L G L Q S Q L V P I L A N I L E V E Q A K C W G F D Q F F A 300
 m i k k - i 226 : G P R R N K E I M Y R I T T E K P A G A I S E T Q K Q E N G P L E W S Y S L P I T C R L S M G L Q N Q L V P I L A N I L E V E E D K C W G F D Q F F A 300

 h i k k - i 301 : E T S D I L Q R V V H V F S L S Q A V L H H I Y I H A H N T I A I F E A V H K Q T S A P R H Q E Y L F E G H L C V L E P S V S A Q H I A H T A 375
 m i k k - i 301 : E T S D I L Q R T V I H V F S L P Q A V L H H V Y I H A H N T I A I F L E A V Y E Q T N V T P K H Q E Y L F E G H P C V L E P S L S A Q H I A H T A 375

 h i k k - i 376 : S S P L T L F S - T A - I P K G L A F R D P A L D V P K F V P K V D L Q A D Y N T A K G V L G A G Y Q A L R A R A L D G Q E L M F R G L H W V M E 448
 m i k k - i 376 : S S P L T L F S M S S D T P K G L A F R D P A L D V P K F V P K V D L Q A D Y S T A K G V L G A G Y Q A L W L A R V L L D G Q A L M L R G L H W V L E 450

 h i k k - i 449 : V L Q A T C R R T L E V A R T S L L Y L S S S L G T E R F S S V A G T P E I Q E L K A A E L R S R L R T L A E V L S R C S Q N I T E T Q E S L S S I 523
 m i k k - i 451 : V L Q D T C Q Q T L E V T R T A L L Y L G S S L G T E R F S S G S G M P D V Q E R K E A T E L R T L Q T L S E I L S K C S H N V T E T Q R S L S C L 525

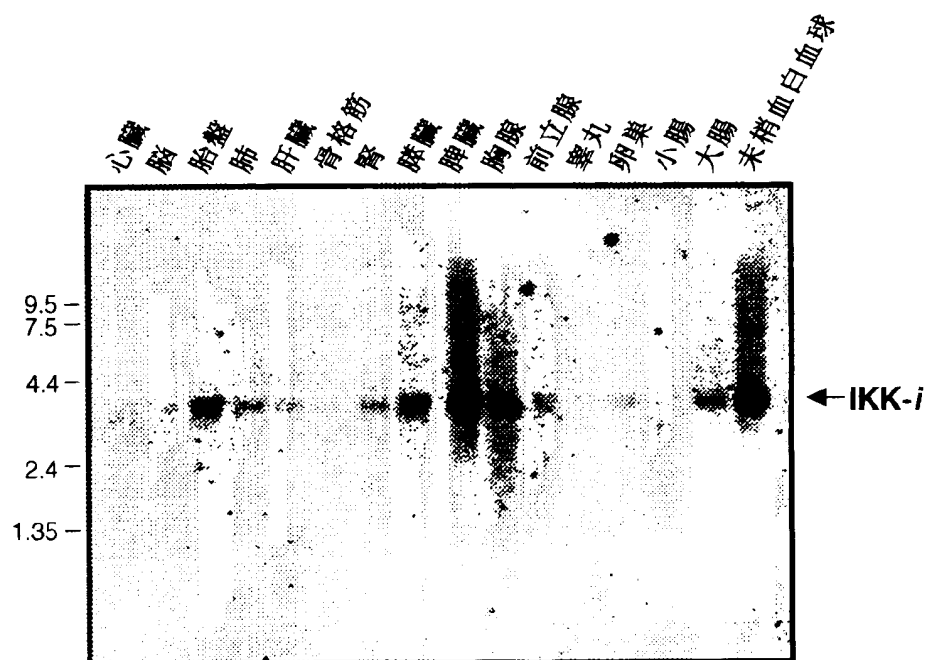
 h i k k - i 524 : N R E L V K S R D Q V H E D - R S I Q Q I Q C C L D K M N F I Y K Q F K K S R M R P G L G Y N E E Q I H K L D K V N F S H L A K R L L Q V F Q E E C V 597
 m i k k - i 526 : G E L L K N R D Q I H E D N K S I Q K I Q C C L D K M H F I Y K Q F K K S R M R P G L S Y N E E Q I H K L D K V N F S H L A K R L L Q V F Q E E C V 600

 h i k k - i 598 : Q K Y Q A S L V T H G K R M R V M H E T R N H L R L V J C S V A A C N T E A Q Q V Q E S L S K L L E E D S H Q L Q D R A K G A Q A S P P I A P Y P 672
 m i k k - i 601 : Q T Y Q V S L V T H G K R M R O V O R A Q N H L H L I C H S V A T C N S E A R G A Q E S L N K I F D Q L - - L L D R A S E Q G A E V S P Q E M A P H P 673

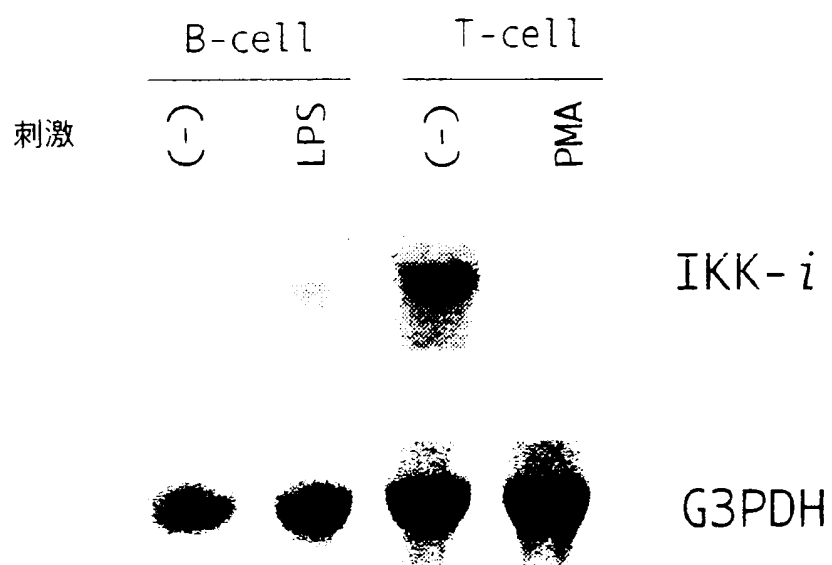
 h i k k - i 673 : S P T R K D L L L H M Q E L C E G M K L L A S D L D N N R I I E R L N R V P A P P D V 716
 m i k k - i 674 : G P D P K D L V F H M Q E L C N D M K L L A F D L Q D N N R L I E R L H R V P S A P D V 717

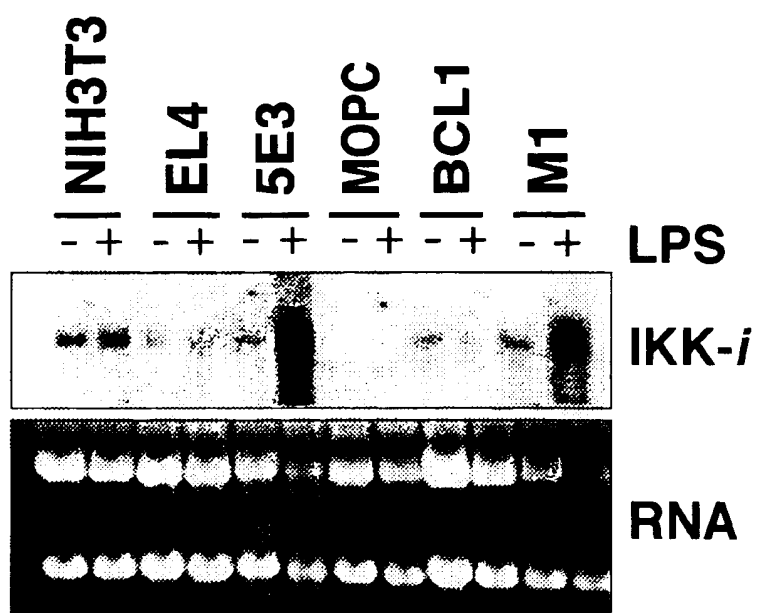
hhikk- α 641 SLSKLLLEELSHQLQDRAKGAQASPPPTAPYSEETK--DULLHMOEAGEGM--KLLASDLLDNRIIERENRVAPPD-----V
 hhikk- β 668 PVSGSDSMNASRUSQPGQLMSQPSSTASNSLREPAKKEEHHVAKINJC--TLLENAIQDTVRQDSFTALDWSWSETEEEHSCLEQAS
 hhikk- α 670 SLEGAVTPQTSAWNP-FTSAEHDHHELSGVVTPQDGETSAQMIEENLN-CLGHLESTILHEANEEQNGSNMNNIDWSWU-----TE

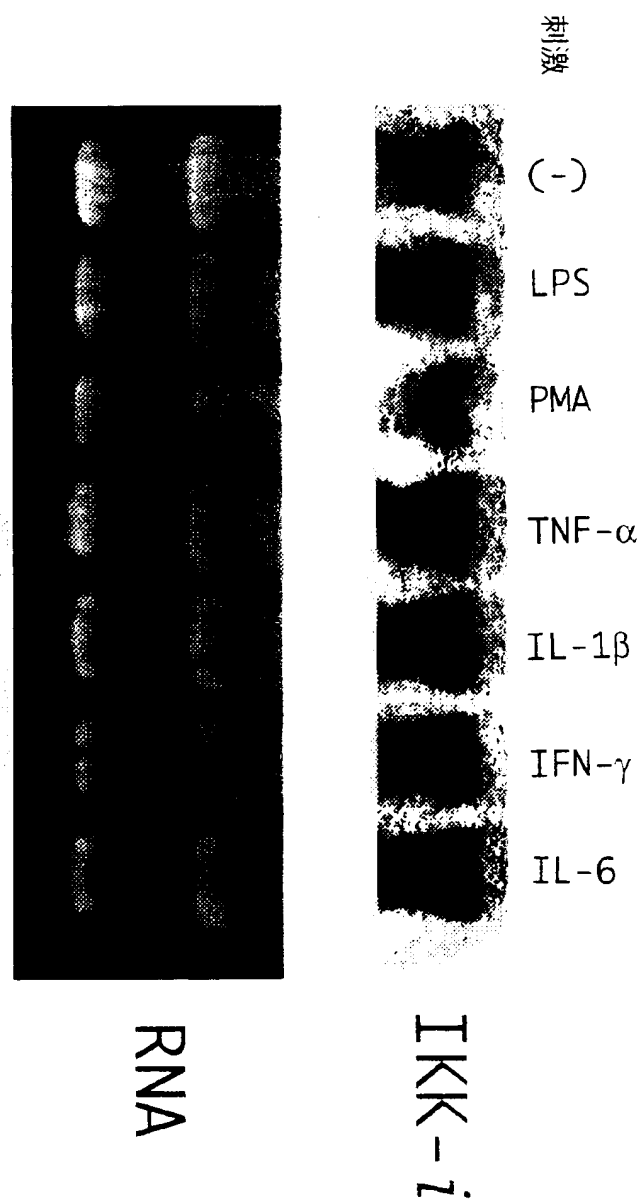
第 5 図

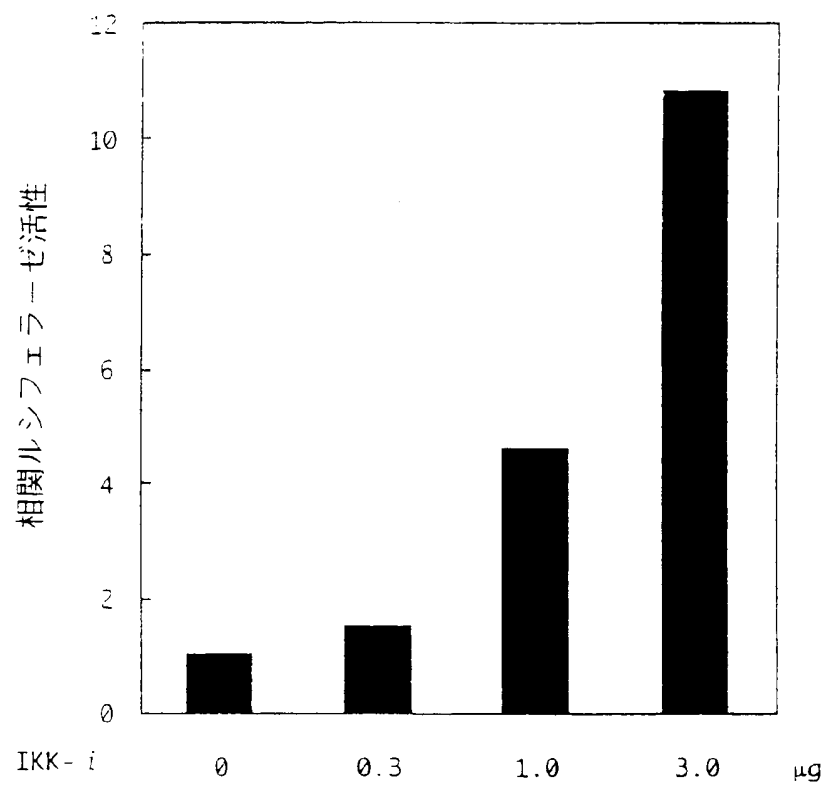
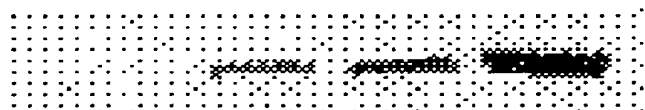


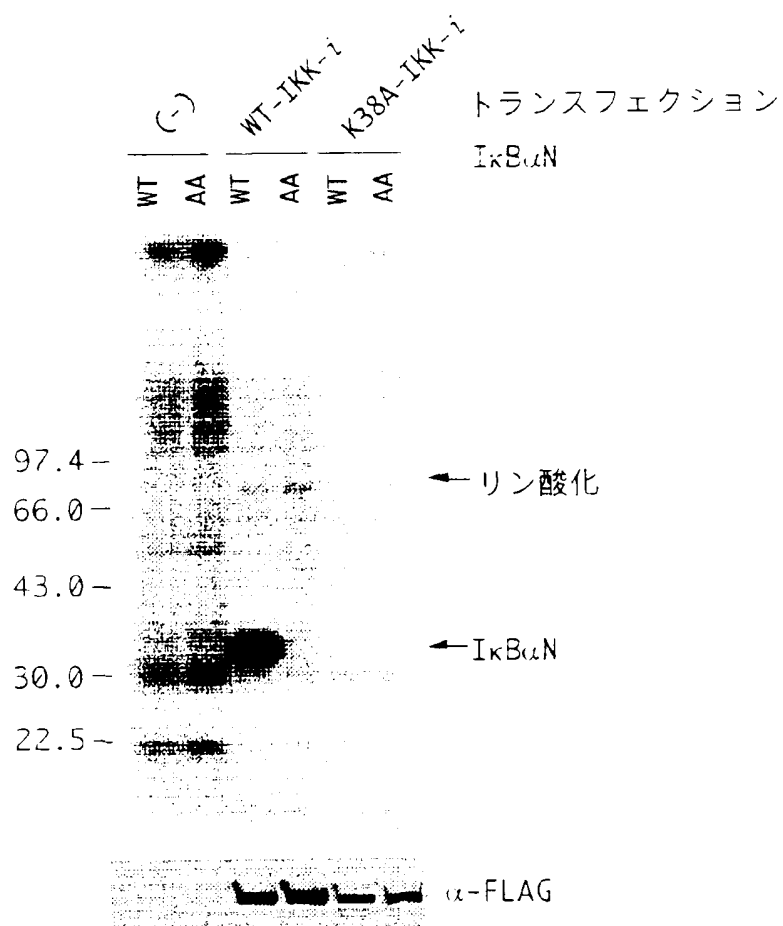
第 6 図



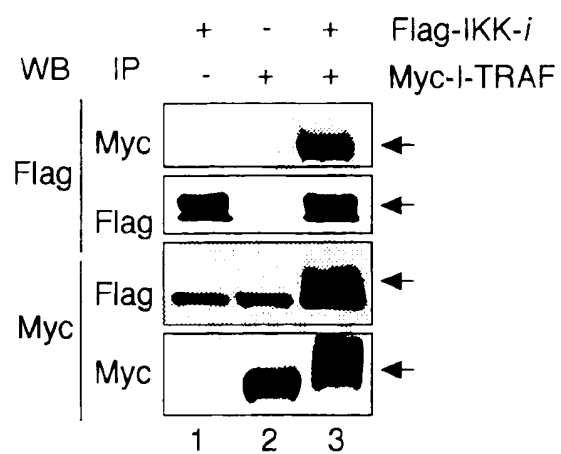




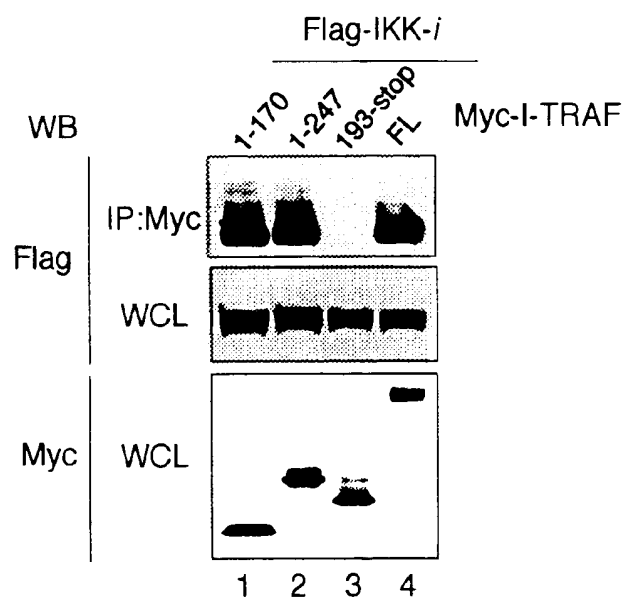
IKK- α の NF- κ B 活性化能の発現 α -FLAG



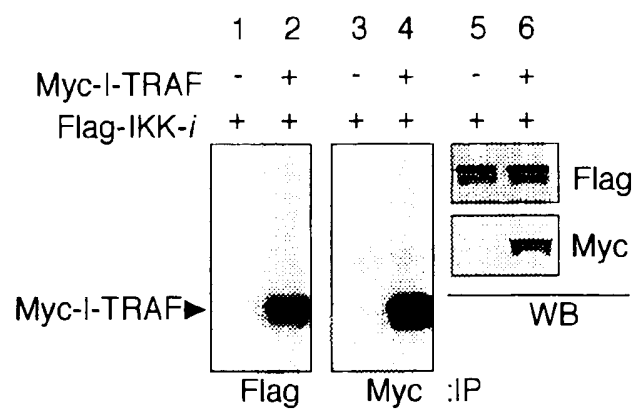
第 1 1 図



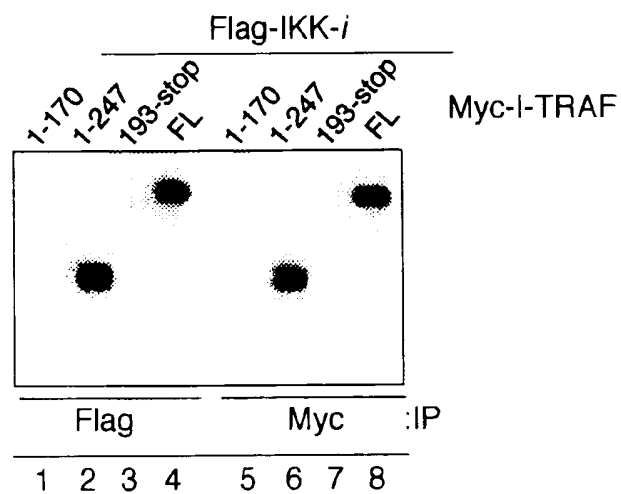
第 1 2 図

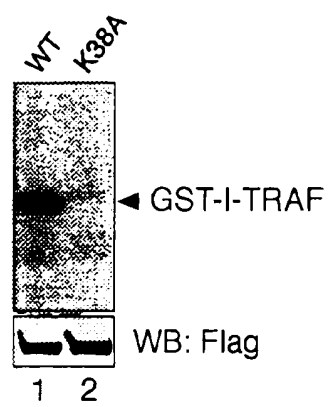


第 13 図



第 14 図





配列表

SEQUENCE LISTING

<110> Japan Science And Technology Corporation

<120> Identification of Novel Substrate I-TRAF of IKK-i Kinase

<130> JA901491

<160> 4

<210> 1

<211> 2154

<212> DNA

<213> Human

<400> 1

```

agatgcagag cacagccaat tacctgtggc acacagatga cctgctgggg cagggggcca      60
ctgccagtgt gtacaaggcc cgcaacaaga aatccggaga gctggttgct gtgaaggctct    120
tcaacactac cagctacctg cgcccccgcg aggtgcaggt gagggagttt gaggtcctgc     180
ggaagctgaa ccaccagaac atcgtaagc tctttgcggt ggaggagacg ggcggaagcc     240
ggcagaaggt actggtgatg gagtactgct ccagtgggag cctgctgagt gtgctggaga     300
gccctgagaa tgcctttggg ctgcctgagg atgagttcct ggtgggtgctg cgctgtgtgg     360
tgcccggcac gaaccacctg cgggagaacg gcattgtgca tcgcgacatc aagccgggga     420
acatcatgcg cctcgtaggg gaggaggggc agagcatcta caagctgaca gacttcggcg     480
ctgcccggga gctggatgat gatgagaagt tcgtctcggt ctatgggact gaggagtacc     540
tgcatccga catgtatgag cgggcggtgc ttcgaaagcc ccagcaaaaa gcgttcgggg     600
tgactgtgga tctctggagc attggagtga ccttgtacca tgcagccact ggcagcctgc     660
ccttcatccc ctttggtggg ccacggcgga acaaggagat catgtaccgg atcaccacag     720

```

```

agaagccggc tggggccatt gcaggtgcc agaggcggga gaacggggccc ctggagtgga 780
gtacacacct ccccatcacc tgccagctgt cactggggct gcagagccag ctggtgccc 840
tcttgccaa catcctggag gtggagcagg ccaagtgtg gggcttcgac cagtctttg 900
cggagaccag tgacatcctg cagcgagttg tegtccatgt cttctccctg tcccaggcag 960
tctgcacca catctatc catgccaca acacgatagc cattttccag gagccgtgc 1020
acaagcagac cagtgtggcc ccccgacacc aggagtacct ctttgagggt cacctctgtg 1080
tctcgagcc cagcgtctca gcacagcaca tgcccacac gacggcaagc agccccctga 1140
ccctcttcag cacagccatc cctaaggggc tggccttcag ggaccctgct ctggacgtcc 1200
ccaagtctgt ccccaaagt gacctgcagg cggattacaa cactgccaag ggcgtgttg 1260
gcgcgggcta ccaggccctg cggctggcac gggccctgct ggatgggcag gagctaatgt 1320
ttcgggggct gcactgggtc atggaggtgc tccaggccac atgcagacgg actctggaag 1380
tggaaggac atccctctc tacctcagca gcagcctggg aactgagagg ttcagcagc 1440
tggtggaac gcctgagatc caggaactga aggcggctgc agaactgagg tccagctgc 1500
ggactctagc ggaggtctc tccagatgct cccaaaatat cacggagacc caggagagcc 1560
tgagcagcct gaaccgggag ctggtgaaga gccgggatca ggtacatgag gacagaagca 1620
tccagcagat tcagtgtgt ttggacaaga tgaattcat ctacaaacag ttcaagaagt 1680
ctaggatgag gccagggctt ggctacaacg aggagcagat tcacaagctg gataaggtga 1740
atttcagtca tttagccaaa agactcctgc aggtgttcca ggaggagtgc gtgcagaagt 1800
atcaagcgtc cttagtcaca cacggcaaga ggatgagggt ggtgcacgag accaggaacc 1860
acctgcgcct ggttggtgt tctgtggctg cctgtaacac agaagcccag ggggtccagg 1920
agagtctcag caagctcctg gaagagctat ctaccagct ccttcaggac cgagcaaagg 1980
gggtcagge ctgcgcct cccatagctc cttaccccag ccctacacga aaggacctgc 2040
ttctccacat gcaagagctc tgcgagggga tgaagctgt ggcatctgac ctctggaca 2100
acaaccgcat catcgaacgg ctaaataagag tcccagcacc tctgatgtc tgag 2154

```

<210> 2

<211> 716

<212> PRT

<213> Human

<400> 2

Met Gln Ser Thr Ala Asn Tyr Leu Trp His Thr Asp Asp Leu Leu	15
Gly Gln Gly Ala Thr Ala Ser Val Tyr Lys Ala Arg Asn Lys Lys	30
Ser Gly Glu Leu Val Ala Val Lys Val Phe Asn Thr Thr Ser Tyr	45
Leu Arg Pro Arg Glu Val Gln Val Arg Glu Phe Glu Val Leu Arg	60
Lys Leu Asn His Gln Asn Ile Val Lys Leu Phe Ala Val Glu Glu	75
Thr Gly Gly Ser Arg Gln Lys Val Leu Val Met Glu Tyr Cys Ser	90
Ser Gly Ser Leu Leu Ser Val Leu Glu Ser Pro Glu Asn Ala Phe	105
Gly Leu Pro Glu Asp Glu Phe Leu Val Val Leu Arg Cys Val Val	120
Ala Gly Met Asn His Leu Arg Glu Asn Gly Ile Val His Arg Asp	135
Ile Lys Pro Gly Asn Ile Met Arg Leu Val Gly Glu Glu Gly Gln	150
Ser Ile Tyr Lys Leu Thr Asp Phe Gly Ala Ala Arg Glu Leu Asp	165
Asp Asp Glu Lys Phe Val Ser Val Tyr Gly Thr Glu Glu Tyr Leu	180
His Pro Asp Met Tyr Glu Arg Ala Val Leu Arg Lys Pro Gln Gln	195
Lys Ala Phe Gly Val Thr Val Asp Leu Trp Ser Ile Gly Val Thr	210
Leu Tyr His Ala Ala Thr Gly Ser Leu Pro Phe Ile Pro Phe Gly	225
Gly Pro Arg Arg Asn Lys Glu Ile Met Tyr Arg Ile Thr Thr Glu	240
Lys Pro Ala Gly Ala Ile Ala Gly Ala Gln Arg Arg Glu Asn Gly	255
Pro Leu Glu Trp Ser Tyr Thr Leu Pro Ile Thr Cys Gln Leu Ser	270
Leu Gly Leu Gln Ser Gln Leu Val Pro Ile Leu Ala Asn Ile Leu	285
Glu Val Glu Gln Ala Lys Cys Trp Gly Phe Asp Gln Phe Phe Ala	300
Glu Thr Ser Asp Ile Leu Gln Arg Val Val Val His Val Phe Ser	315
Leu Ser Gln Ala Val Leu His His Ile Tyr Ile His Ala His Asn	330
Thr Ile Ala Ile Phe Gln Glu Ala Val His Lys Gln Thr Ser Val	345
Ala Pro Arg His Gln Glu Tyr Leu Phe Glu Gly His Leu Cys Val	360
Leu Glu Pro Ser Val Ser Ala Gln His Ile Ala His Thr Thr Ala	375
Ser Ser Pro Leu Thr Leu Phe Ser Thr Ala Ile Pro Lys Gly Leu	390
Ala Phe Arg Asp Pro Ala Leu Asp Val Pro Lys Phe Val Pro Lys	405
Val Asp Leu Gln Ala Asp Tyr Asn Thr Ala Lys Gly Val Leu Gly	420

Ala Gly Tyr Gln Ala Leu Arg Leu Ala Arg Ala Leu Leu Asp Gly	435
Gln Glu Leu Met Phe Arg Gly Leu His Trp Val Met Glu Val Leu	450
Gln Ala Thr Cys Arg Arg Thr Leu Glu Val Ala Arg Thr Ser Leu	465
Leu Tyr Leu Ser Ser Ser Leu Gly Thr Glu Arg Phe Ser Ser Val	480
Ala Gly Thr Pro Glu Ile Gln Glu Leu Lys Ala Ala Ala Glu Leu	495
Arg Ser Arg Leu Arg Thr Leu Ala Glu Val Leu Ser Arg Cys Ser	510
Gln Asn Ile Thr Glu Thr Gln Glu Ser Leu Ser Ser Leu Asn Arg	525
Glu Leu Val Lys Ser Arg Asp Gln Val His Glu Asp Arg Ser Ile	540
Gln Gln Ile Gln Cys Cys Leu Asp Lys Met Asn Phe Ile Tyr Lys	555
Gln Phe Lys Lys Ser Arg Met Arg Pro Gly Leu Gly Tyr Asn Glu	570
Glu Gln Ile His Lys Leu Asp Lys Val Asn Phe Ser His Leu Ala	585
Lys Arg Leu Leu Gln Val Phe Gln Glu Glu Cys Val Gln Lys Tyr	600
Gln Ala Ser Leu Val Thr His Gly Lys Arg Met Arg Val Val His	615
Glu Thr Arg Asn His Leu Arg Leu Val Gly Cys Ser Val Ala Ala	630
Cys Asn Thr Glu Ala Gln Gly Val Gln Glu Ser Leu Ser Lys Leu	645
Leu Glu Glu Leu Ser His Gln Leu Leu Gln Asp Arg Ala Lys Gly	660
Ala Gln Ala Ser Pro Pro Pro Ile Ala Pro Tyr Pro Ser Pro Thr	675
Arg Lys Asp Leu Leu Leu His Met Gln Glu Leu Cys Glu Gly Met	690
Lys Leu Leu Ala Ser Asp Leu Leu Asp Asn Asn Arg Ile Ile Glu	705
Arg Leu Asn Arg Val Pro Ala Pro Pro Asp Val ***	716

<210> 3

<211> 2910

<212> DNA

<213> Mouse

<400> 3

gaattcggca cgagaagata gccaaagccca ggagatgcag agtaccacta actacctgtg	60
gcatactgat gacctgctag ggcagggggc cactgccagt gtgtacaagg cccgaaacaa	120
gaaatccggg gaggtggttg ctgtaaaggt cttcaactca gccagctatc ggcgacctcc	180

tgaggttcag gtgaggaggt ttgaggtcct gcggaggctg aatcaccaga acatcgtgaa	240
gctattcgca gtggaggaaa cgggaggcag ccggcagaag gtgctaata tggagtactg	300
ctccagtggg agcctgctga gcgtgctgga agaccctgag aacacgttcg ggctttctga	360
agaggagttc ctagtggtgc tgcgctgtgt ggtggctggc atgaaccacc tgcgggagaa	420
tggcattgtc catcgggaca tcaaacctgg gaacatcatg cgccgggtgg gcgaggaggg	480
gcagagcacc tataagctgt ctgacttcgg ggctgcccgc aagctggacg atgatgagaa	540
gtttgtttct gtctatggta cagaggaata cctgcacct gacatgtatg agcgtgcagt	600
gctgcgcaaa ccccagcaaa aggcatttgg tgtgactgtg gatctctgga gtattggggt	660
gacctgtac cagcagcca caggcagtct gcccttcacc cccttcgggtg ggccccggcg	720
caacaaagag atcatgtaca gaatcaccac agagaagcca gccggggcca ttccaggagc	780
tcagaagcag gaaaaatggc ccttggagtg gagctacagc ctcccatca cctgtagact	840
gtccatgggg ctgcagaacc agctgggtgc cactctggcc aacatcctgg aggtggaaga	900
ggataagtgc tggggctttg atcagttctt cgcggagacc agtgacattc tgcagcgaac	960
ggtcaccac gtcttttccc taccacaggc cgttttgcac catgtctaca tccacgccc	1020
caacacgatt gccatctttt tggaggctgt atatgagcag accaacgtga cccccaaaca	1080
ccaggagtac ctcttcgagg gtcacccttg tgccttgag ccaagcctct cagcccagca	1140
catgcccac acagctgcca gcagccctct aactctgttc agcatgtcca gcgacacacc	1200
taaggggctg gccttcaggg acctgctct ggatgtccca aagttcgtcc ctaaggttga	1260
cctacaggcc gattacagca cagctaaggg ggtgctgggc gctggctacc aggcctgtg	1320
gctggcgagg gtctgctgg atggacaggc gttgatgctt cgggggttac attgggtcct	1380
ggaggtgctt caggacacgt gccagcagac actggaggtc acacggacag cctctctcta	1440
cctcggcagc agcctgggca ctgaaagggt cagcagtgga tcggggatgc ctgacgtcca	1500
ggaacgaaag gaggccacag agctaagaac caggctgcag actctctcag agatcctgtc	1560
taaatgttcc cacaatgtca cagaaacca aaggagcctg agctgtctgg gtgaagagct	1620
tttaaagaac cgggaccaga ttcattgagga taacaaaagt atccagaaga ttcagtgttg	1680
tttggaacag atgcacttca tctacaaaca gttcaagaaa tccaggatga ggccagggct	1740
cagctacaat gaggagcaga tccacaagct ggataaggta aatttcagtc atctagccaa	1800
gaggctgctg cagggtgttc aggaggagtg tgtgcagacg tatcagggtg cgctggtcac	1860
acacggcaag cggatgaggc aggtgcagag ggcccagaac cacctgcacc tcattggcca	1920

ctctgtggee acctgtaact cggaagcccg gggagcccag gagagtctga acaagatctt 1980
 tgatcagctc ctcttggaac gagcttccga acagggagct gagggtgcac cgcaacctat 2040
 ggctctcat cccggccctg atccgaagga cctgggtcttc cacatgcagg agctttgtaa 2100
 tgatatgaag ctattggcct ttgatctcca ggacaacaac cgactcatcg aacggttaca 2160
 tagagttcca tcggcaccag atgtctgagc tccctggggg ttcacaaggc aclcagaagc 2220
 aatagaaaca ttcatattgt accctacac tgtgagacca aattcagggc aagttctggt 2280
 tccatctcac tagcctacct cctcttggc cattggccat tggccaacaa actagcatta 2340
 ctttgactgt cctcttgga agcagctagg acagggactc ctggccatcc caggcagtat 2400
 ctacagaaga gaccatgagg ctaccacagc cttatcaaga caccaagact gttcttctt 2460
 acccaggctc tggagggtctg gtcttgaaa gaaaaggctc agccctctca cgctttgcac 2520
 ttcccaggac cagcaggcat ctctgtgga ttctctgccc tctccagggt gctggatcag 2580
 aatgcttatt ctteggtgtt tctgtgctg ttctctgagt gtcccatcc cctggcctca 2640
 ggcaaccac aaacggcccc tctgtgctg gtctagatgc acctgcattt gagaaagtgg 2700
 gtgggtgagg ctaactgctg gtgcttgag gattctctt gacctttct cagaggaacg 2760
 cttggttcta agaaacagct ggtcagtatc aaccacagcc atgctaactg gacagatgtt 2820
 ggaacccaaa gtcctaagga gagagcaggc ctgcacctc agacatggaa taaatacatc 2880
 gccttttctg tttaaaaaaa aaaaaaaaaa 2910

<210> 4

<211> 717

<212> PRT

<213> Mouse

Met Gln Ser Thr Thr Asn Tyr Leu Trp His Thr Asp Asp Leu Leu 15
 Gly Gln Gly Ala Thr Ala Ser Val Tyr Lys Ala Arg Asn Lys Lys 30
 Ser Gly Glu Val Val Ala Val Lys Val Phe Asn Ser Ala Ser Tyr 45
 Arg Arg Pro Pro Glu Val Gln Val Arg Glu Phe Glu Val Leu Arg 60
 Arg Leu Asn His Gln Asn Ile Val Lys Leu Phe Ala Val Glu Glu 75
 Thr Gly Gly Ser Arg Gln Lys Val Leu Ile Met Glu Tyr Cys Ser 90
 Ser Gly Ser Leu Leu Ser Val Leu Glu Asp Pro Glu Asn Thr Phe 105

Gly Leu Ser Glu Glu Glu Phe Leu Val Val Leu Arg Cys Val Val	120
Ala Gly Met Asn His Leu Arg Glu Asn Gly Ile Val His Arg Asp	135
Ile Lys Pro Gly Asn Ile Met Arg Leu Val Gly Glu Glu Gly Gln	150
Ser Ile Tyr Lys Leu Ser Asp Phe Gly Ala Ala Arg Lys Leu Asp	165
Asp Asp Glu Lys Phe Val Ser Val Tyr Gly Thr Glu Glu Tyr Leu	180
His Pro Asp Met Tyr Glu Arg Ala Val Leu Arg Lys Pro Gln Gln	195
Lys Ala Phe Gly Val Thr Val Asp Leu Trp Ser Ile Gly Val Thr	210
Leu Tyr His Ala Ala Thr Gly Ser Leu Pro Phe Ile Pro Phe Gly	225
Gly Pro Arg Arg Asn Lys Glu Ile Met Tyr Arg Ile Thr Thr Glu	240
Lys Pro Ala Gly Ala Ile Ser Gly Thr Gln Lys Gln Glu Asn Gly	255
Pro Leu Glu Trp Ser Tyr Ser Leu Pro Ile Thr Cys Arg Leu Ser	270
Met Gly Leu Gln Asn Gln Leu Val Pro Ile Leu Ala Asn Ile Leu	285
Glu Val Glu Glu Asp Lys Cys Trp Gly Phe Asp Gln Phe Phe Ala	300
Glu Thr Ser Asp Ile Leu Gln Arg Thr Val Ile His Val Phe Ser	315
Leu Pro Gln Ala Val Leu His His Val Tyr Ile His Ala His Asn	330
Thr Ile Ala Ile Phe Leu Glu Ala Val Tyr Glu Gln Thr Asn Val	345
Thr Pro Lys His Gln Glu Tyr Leu Phe Glu Gly His Pro Cys Val	360
Leu Glu Pro Ser Leu Ser Ala Gln His Ile Ala His Thr Ala Ala	375
Ser Ser Pro Leu Thr Leu Phe Ser Met Ser Ser Asp Thr Pro Lys	390
Gly Leu Ala Phe Arg Asp Pro Ala Leu Asp Val Pro Lys Phe Val	405
Pro Lys Val Asp Leu Gln Ala Asp Tyr Ser Thr Ala Lys Gly Val	420
Leu Gly Ala Gly Tyr Gln Ala Leu Trp Leu Ala Arg Val Leu Leu	435
Asp Gly Gln Ala Leu Met Leu Arg Gly Leu His Trp Val Leu Glu	450
Val Leu Gln Asp Thr Cys Gln Gln Thr Leu Glu Val Thr Arg Thr	465
Ala Leu Leu Tyr Leu Gly Ser Ser Leu Gly Thr Glu Arg Phe Ser	480
Ser Gly Ser Gly Met Pro Asp Val Gln Glu Arg Lys Glu Ala Thr	495
Glu Leu Arg Thr Arg Leu Gln Thr Leu Ser Glu Ile Leu Ser Lys	510
Cys Ser His Asn Val Thr Glu Thr Gln Arg Ser Leu Ser Cys Leu	525
Gly Glu Glu Leu Leu Lys Asn Arg Asp Gln Ile His Glu Asp Asn	540

Lys Ser Ile Gln Lys Ile Gln Cys Cys Leu Asp Lys Met His Phe	555
Ile Tyr Lys Gln Phe Lys Lys Ser Arg Met Arg Pro Gly Leu Ser	570
Tyr Asn Glu Glu Gln Ile His Lys Leu Asp Lys Val Asn Phe Ser	585
His Leu Ala Lys Arg Leu Leu Gln Val Phe Gln Glu Glu Cys Val	600
Gln Thr Tyr Gln Val Ser Leu Val Thr His Gly Lys Arg Met Arg	615
Gln Val Gln Arg Ala Gln Asn His Leu His Leu Ile Gly His Ser	630
Val Ala Thr Cys Asn Ser Glu Ala Arg Gly Ala Gln Glu Ser Leu	645
Asn Lys Ile Phe Asp Gln Leu Leu Leu Asp Arg Ala Ser Glu Gln	660
Gly Ala Glu Val Ser Pro Gln Pro Met Ala Pro His Pro Gly Pro	675
Asp Pro Lys Asp Leu Val Phe His Met Gln Glu Leu Cys Asn Asp	690
Met Lys Leu Leu Ala Phe Asp Leu Gln Asp Asn Asn Arg Leu Ile	705
Glu Arg Leu His Arg Val Pro Ser Ala Pro Asp Val ***	717

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/05916

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁶ C12N 15/54, C12N 9/12, A61K 31/70, A61K 38/46

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁶ C12N 15/54, C12N 9/12, A61K 31/70, A61K 38/46

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG), GeneSeq/GenBank/EMBL/DDBJ

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	Database BIOSIS on DIALOG, BIOSIS No.19900377627, Shimada T., et al., "IKK-i, a novel lipopolysaccharide-inducible kinase that is related to IkappaB kinases", abstract, (International Immunology (1999.Aug), Vol. 11, No. 8, pages 1357-1362)	1-8
A	Nagase T., et al., "Prediction of the coding sequences of unidentified human genes", DNA Res. (1995), Vol. 2, pages 167-174, Table 1, 3, KIAA0151 "Gene"	1-8
A	US, 5776717, A (Tularik Inc.), 07 July, 1998 (07.07.98), Claim 1, 15-18 & WO, 98/39410, A	1-8
A	Ebrahim Z., et al., "The IκB kinase complex (IKK) contains two kinase subunits, IKKα and IKKβ, necessary for IκB phosphorylation and NF-κB activation", Cell (1997), Vol. 91, No. 2, Pages 243-252	1-8

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
07 December, 1999 (07.12.99)Date of mailing of the international search report
14 December, 1999 (14.12.99)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/05916

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Joseph A., et al., "A cytokine-responsive I κ B kinase that activates the transcription factor NF- κ B", Nature (1997), Vol. 288, No. 6642, pages 548-554	1-8
A	Frank Mercurio et al., "IKK-1 and IKK-2: cytokine-activated I κ B kinases essential for NF- κ B activation", Science (1997), Vol. 278, pages 860-866	1-8
A	John D., et al., "I κ B kinase- β : NF- κ B activation and complex formation with I κ B kinase- α and NIK", Science (1997), Vol. 278, pages 866-8869	1-8
A	Catherine H., et al., "Identification and characterization of an I κ B kinase", Cell (1997), Vol. 90, No. 2, Pages 373-383	1-8

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl ⁸ C12N 15/54, C12N 9/12, A61K 31/70, A61K 38/46		
B. 調査を行った分野		
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl ⁸ C12N 15/54, C12N 9/12, A61K 31/70, A61K 38/46		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)		
BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG), GeneSeq/GenBank/EMBL/DBJ		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
PX	Database BIOSIS on DIALOG, BIOSIS No. 19900377627, Shimada T., et al. "IKK-i, a novel lipopolysaccharide- inducible kinase that is related to IkappaB kinases", abstract, (International Immunology (1999. Aug), Vol. 11, No. 8, p. 1357-1362)	1-8
A	Nagase T., et al. "Prediction of the coding sequences of unid entified human genes", DNA Res. (1995), Vol. 2, p. 167-174, Table 1及び3のKIAA0151遺伝子参照	1-8
A	US, 5776717, A (Tularik Inc.) 7.7月. 1998 (07.07.98) 請求項 1 及び第 15-18 欄参照 & WO, 98/39410, A	1-8
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日	07.12.99	国際調査報告の発送日 14.12.99
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 富永 みどり	4 N 9 1 5 2
電話番号 03-3581-1101 内線 3488		

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Ebrahim Z., et al. "The I κ B kinase complex(IKK) contains two kinase subunits, IKK α and IKK β , necessary for I κ B phosphorylation and NF- κ B activation", Cell(1997), Vol.91, No.2, P.243-252	1-8
A	Joseph A., et al. "A cytokine-responsive I κ B kinase that activates the transcription factor NF- κ B", Nature(1997), Vol.288, No.6642, p.548-554	1-8
A	Frank Mercurio et al. "IKK-1 and IKK-2: cytokine-activated I κ B kinases essential for NF- κ B activation", Science(1997), Vol.278, p.860-866	1-8
A	John D., et al. "I κ B kinase- β : NF- κ B activation and complex formation with I κ B kinase- α and NIK", Science(1997), Vol.278, p.866-8869	1-8
A	Catherine H., et al. "Identification and characterization of an I κ B kinase", Cell(1997), Vol.90, No.2, P.373-383	1-8